

Entwicklung und Anwendung synthetischer RNA-Schalter zur Regulation der Genexpression

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

vorgelegte Dissertation von

Dipl.-Biol. Michael Martin Rudolph

aus Erfurt

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 15.06.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2015

Darmstadt 2016

D 17

Die einzige Konstante im Universum ist die Veränderung.

Heraklit von Ephesus

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. Beatrix Süß für die Überlassung der interessanten Projekte und der Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in ihrem Labor. Ich danke für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und für das große Vertrauen, dass mir in meinem Arbeiten stets gewährt wurde. Ebenso dankbar bin ich für die aktive Teilnahme an vielen spannenden Tagungen und Kongressen sowie an zahlreichen Gruppenausflügen.

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich recht herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Alexander Heckel, der mich in die Welt der Photoschalter eingeführt hat und der durch seine äußerst kooperative und positiv gestimmte Zusammenarbeit dieses Projektes maßgeblich vorangetrieben hat. Seinem Doktoranden Thomas Halbritter gebührt ein ebenso großer Dank für die Synthese aller Moleküle, ohne die die Durchführung dieser Arbeit undenkbar gewesen wäre.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Süß, welche mir das Einleben zunächst in Frankfurt und dann in Darmstadt sehr erleichtert haben. Julia und Michael danke ich dafür, dass sie mir so viel Wissen über RNA, Riboswitch und Streptomyceten vermittelt haben. Für die tolle Arbeitsatmosphäre und unzählige lustige Begebenheiten danke ich insbesondere Nona, Katrin, Britta Kluge, Cristina und natürlich Florian, ohne welchen das Labor ein trostloser Ort wäre. Charlotte Kaspar danke ich dafür, dass sie die beste Bachelorstudentin war, die man sich vorstellen kann. Für ihre an Zuverlässigkeit, Ordnung und Hilfsbereitschaft nicht zu überbietende Art – auch außerhalb des Labors – wird Britta Schreiber gedankt!

Letztendlich danke ich allen Menschen, die von mir gegangen sind und mich trotzdem – oder gerade deswegen – zu demjenigen gemacht haben, der ich heute bin.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Rudolph MM, Vockenhuber MP & Suess B (2013) Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **159**: 1416-1422.

Rudolph MM, Vockenhuber MP & Suess B (2015) Conditional control of gene expression by synthetic riboswitches in *Streptomyces coelicolor*. *Methods Enzymol* **550**: 283-299.

Inhalt

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung.....	9
2.1	RNA-Schalter in der Synthetischen Biologie	9
2.2	Aptamere	10
2.2.1	Struktur und Funktionsweise von Aptameren	10
2.2.2	Einsatzmöglichkeiten von Aptameren.....	11
2.3	<i>In vitro</i> -Selektion von Aptameren (SELEX)	12
2.3.1	Prinzip	12
2.3.2	Nukleinsäurebibliothek	15
2.3.3	SELEX gegen niedermolekulare Verbindungen	16
2.4	Riboswitche	19
2.4.1	Natürliche Riboswitche	19
2.4.2	Synthetische Riboswitche	21
2.5	Entwicklung photoschaltbarer Riboswitche	25
2.5.1	Photochromie	25
2.5.2	Photoschaltbare Aptamer-Ligandenkomplexe	27
2.5.3	Photoschaltbare Riboswitche.....	28
2.6	Konditionale Genexpression in <i>Streptomyces coelicolor</i>	30
2.6.1	<i>S. coelicolor</i> als Modellorganismus der Actinomyceten.....	30
2.6.2	Charakterisierung von <i>S. coelicolor</i>	30
2.6.3	Systeme zur konditionalen Genexpression in Streptomyceten	32
2.7	Zielsetzung dieser Arbeit	34
3	Experimenteller Teil.....	35
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	35
3.2	Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme.....	36
3.3	Medien und Puffer	40
3.4	Oligonukleotide	44
3.5	Bakterien- und Hefestämme.....	46
3.6	Molekulargenetische Methoden	46
3.6.1	Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	46
3.6.2	Gelelektrophorese.....	46
3.6.3	Präzipitation von Nukleinsäuren	47
3.6.4	Phenolisierung von Nukleinsäuren	48
3.6.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Gelen	48

3.6.6	Isolierung von Plasmid-DNA	48
3.6.7	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	48
3.6.8	Ligationen von DNA-Fragmenten	48
3.6.9	5'-Dephosphorylierung und 5'-Phosphorylierung von Nukleinsäuren.....	49
3.6.10	Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA.....	49
3.6.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
3.6.12	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	50
3.6.13	Sequenzierung von DNA	51
3.6.14	<i>In vitro</i> -Transkription	51
3.7	Stammhaltung und Gentechnische Modifizierung von Mikroorganismen	51
3.7.1	Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen	51
3.7.2	DNA-Transfer in Bakterien und Hefen	53
3.8	Reporter-Gen-Assays.....	53
3.8.1	Gus-Messung bei <i>S. coelicolor</i>	53
3.8.2	GFP-Messung bei <i>S. cerevisiae</i>	54
3.9	Software	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Grundlagen zur <i>in vitro</i> -Selektion von RNA-Aptameren.....	56
4.1.1	RNA-Bibliotheken.....	56
4.1.2	Verwendete Azobenzolderivate	57
4.2	<i>In vitro</i> -Selektion von RNA-Aptameren gegen Azobenzole unter Verwendung paramagnetischer Partikel.....	59
4.2.1	Immobilisierung von TH72-Biotin an Beads.....	59
4.3	Durchführung der SELEX.....	60
4.3.2	Bindungsstudien des angereicherten Pools an Beads	62
4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse.....	64
4.3.4	Bindungsstudien individueller Aptamerklone	67
4.3.5	Bindungsstudien mit Aptamer F10.....	67
4.3.6	Isotherme Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Bindeaffinität zwischen Aptamer F10 und TH72.....	70
4.4	<i>In vitro</i> -Selektion von RNA-Aptameren gegen Azobenzole mittels säulenbasierter Affinitätschromatographie	72
4.4.1	Immobilisierung an eine aktivierte Gelmatrix	72
4.4.2	Durchführung der ersten Runde der <i>in vitro</i> -Selektion	72
4.4.3	Weiterer Verlauf der <i>in vitro</i> -Selektion	75
4.4.4	Sequenz- und Strukturanalyse.....	77
4.4.5	Analyse individueller Aptamerklone durch säulenbasierte Bindungsstudien.....	78
4.4.6	Bindungsstudien mit Aptamerverkürzungen	81
4.4.7	Bindungsstudien mit Aptamerverkürzungen	84
4.4.8	Bindungsstudien mit unterschiedlich belichteten Liganden	86

4.4.9	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	89
4.5	Verwendung azobenzolbindender Aptamere zur Konstruktion synthetischer Riboswitche in <i>S. cerevisiae</i>	96
4.5.1	Eignung des Systems	97
4.5.2	Konstruktion der Riboswitch-Reportergenplasmide.....	98
4.6	Konstruktion riboswitchkontrollierter Expressionssysteme in <i>Streptomyces coelicolor</i>	102
4.6.1	Konstruktion und Integration der <i>gusA</i> -Reportergenplasmide.....	102
4.6.2	Detektion der GusA-Expression auf Festnährböden	105
4.6.3	Bestimmung der GusA-Aktivität von Flüssigkulturen.....	107
5	Diskussion	115
5.1	Entwicklung photoschaltbarer Aptamer-Ligandenkomplexe	115
5.1.1	Generelle Betrachtungen zur Wahl des Selektionssystems: Immobilisierung der Zielmoleküle	115
5.1.2	SELEX unter Verwendung paramagnetischer streptavidinbeschichteter Beads	116
5.1.3	SELEX mittels säulenbasierter Affinitätschromatographie	117
5.1.4	Gegenüberstellung existierender photoschaltbarer Aptamer-Ligandenkomplexe	120
5.1.5	Konstruktion photoschaltbarer Riboswitche.....	122
5.1.6	Konstruktion azobenzolabhängiger Riboswitche	124
5.2	Riboswitchkontrollierte Expressionssysteme in <i>S. coelicolor</i>	126
5.2.1	Beurteilung der unterschiedlichen regulatorischen Aktivitäten der Riboswitche in <i>S. coelicolor</i> und Vergleich zu anderen Bakterienspezies	126
5.2.2	Vergleich der theophyllinabhängigen Riboswitche mit konventionellen konditionalen Genexpressionssystemen in Streptomyceten	130
5.2.3	Anwendungsmöglichkeiten der synthetischen Riboswitche in Streptomyceten.....	133
6	Anhang	136
6.1	Abkürzungen	136
6.2	Einheiten und Dimensionen	137
6.3	Zusätzliche Tabellen.....	138
7	Literatur.....	142
8	Vorträge und Posterbeiträge	155
9	Lebenslauf	156
	Ehrenwörtliche Erklärung	157

1 Zusammenfassung

Der genetische Werkzeugkasten des relativ jungen Forschungsgebietes der Synthetischen Biologie wird ständig durch neue Bauteile erweitert, wobei in den letzten Jahren verstärkt die Anwendung RNA-basierter Regulationselemente in den Fokus gerückt ist. In dieser Arbeit wird die Entwicklung und Anwendbarkeit dieser sogenannten synthetischen Riboswitche zur konditionalen Genexpression für verschiedene Organismen beschrieben.

Im ersten Teil wird die *in vitro*-Selektion (SELEX) von RNA-Aptameren gezeigt, die als sensorische Domänen zum Aufbau dieser Riboswitche genutzt werden können. Als Zielsubstanzen dienten dabei Azobenzole. Das sind photochrome Moleküle, die eine reversible Konformationsänderung durch Licht unterschiedlicher Wellenlängenbereiche erfahren. Die Selektionen hatten dabei das Ziel der Anreicherung photoschaltbarer Aptamer-Ligandenkomplexe, wobei die jeweiligen *trans*-Isomere bevorzugt werden sollten. Zunächst wurde eine *in vitro*-Selektion gegen das Azobenzol TH72 unter Verwendung paramagnetischer streptavidinbeschichteter Partikel durchgeführt. Hier wurde eine Anreicherung bindender RNA-Spezies erzielt, welche jedoch nicht imstande waren, das freie Zielmolekül zu erkennen, sondern eine Abhängigkeit zur Selektionsmatrix aufwiesen. Durch eine SELEX mittels säulenbasierter Affinitätschromatographie gegen die mit einer Chloramphenicolinheit substituierten Azobenzole TH-CA bzw. TH-CA-Amino wurden indes Aptamere identifiziert, welche freie Zielmoleküle binden konnten und sich durch Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich auszeichneten ($K_d = 0,8 - 3,6 \mu\text{M}$). Für die Aptamere 42 und 42_V1 wurden darüber hinaus lichtabhängige Bindeverhalten gezeigt, wobei die *cis*-Isomere der Azobenzole nicht oder nur sehr schwach gebunden wurden. Ein erster Konstruktionsversuch azobenzolabhängiger Riboswitche im Hefetestsystem war noch nicht zielführend.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einsatz synthetischer theophyllinabhängiger Riboswitche zur konditionalen Genexpression in *Streptomyces coelicolor* geprüft. Die von Justin P. Gallivan entwickelten RNA-Schalter ließen sich mit allen drei getesteten Promotoren *galP2*, *ermEp1* und SF14 kombinieren. Hierdurch konnten insbesondere die Riboswitche A und E* als robuste Schaltelemente identifiziert werden, welche eine 30- bis 260-fache Aktivierung der β -Glucuronidaseexpression zuließen. Mit Riboswitch E* ließ sich darüber hinaus zeigen, dass die Genexpression dosisabhängig und zu bestimmten Zeitpunkten der Kultivierung kontrolliert werden konnte. Das Riboswitchsystem zeichnete sich somit als leicht zu implementierende, modular kombinierbare und zudem robuste Methode zur konditionalen Genexpression aus und könnte auch für diverse native und heterologe Proteine in anderen *Streptomyces*-Arten zur Anwendung kommen.

2 Einleitung

2.1 RNA-Schalter in der Synthetischen Biologie

Die Synthetische Biologie ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches ein weites Spektrum an naturwissenschaftlichen Disziplinen – wie Molekularbiologie, Chemie, Biotechnologie und Bioinformatik – zusammenführt und dabei ingenieurwissenschaftliche Prinzipien verfolgt. Das Hauptaugenmerk liegt im Entwurf neuartiger, nicht in der Natur vorkommender biologischer Systeme. Dazu zählt neben der Konstruktion synthetischer Signal- und Stoffwechselwege auch die Erschaffung künstlicher Zellen, Gewebe oder gar Organismen. Der Synthetischen Biologie wird ein großes Anwendungspotential in der Entwicklung von Diagnostika und Therapeutika sowie zur ressourcenschonenden Herstellung von Chemikalien und Biobrennstoffen vorausgesagt (Benner & Sismour, 2005, Heinemann & Panke, 2006).

Bisher haben sich die meisten Ansätze der Synthetischen Biologie auf die Konstruktion genetischer Schaltkreise konzentriert, die auf der Transkriptionsregulation durch Protein-DNA-Interaktionen beruhen. Seit einigen Jahren wird dieser „genetische Werkzeugkasten“ jedoch stetig durch RNA-basierte Regulationselemente erweitert (Isaacs, *et al.*, 2006). Traditionell wurden der RNA nur drei grundlegende Funktionen zugeschrieben, und zwar als Botenstoff der Erbinformation (in Form der mRNA), als essentieller Bestandteil der Proteinbiosynthese (tRNA und rRNA) und als genetisches Material einiger Viren. Die Identifizierung zahlreicher nicht kodierender RNA-Moleküle (ncRNAs), welche als aktive Bestandteile natürlicher molekularer Schaltkreise fungieren, führte zu einem Paradigmenwechsel, der auch als „*The Noncoding RNA Revolution*“ (Cech & Steitz, 2014) bezeichnet werden darf.

Seit ihrer Entdeckung finden vermehrt regulatorisch und katalytisch aktive ncRNAs Einsatz in synthetischen Netzwerken. Hierzu gehört z.B. die gezielte Stilllegung von Genen durch RNA-Interferenz (RNAi) in Eukaryoten, bei welcher miRNAs (*microRNAs*) und siRNAs (*small interfering RNAs*) involviert sind (He & Hannon, 2004, Rao, *et al.*, 2009). In Prokaryoten steuern kleine, regulatorisch aktive sRNAs (*small regulatory RNAs*) die Translationinitiation von Genen oder sie beeinflussen die Aktivität von Proteinen, indem sie spezifisch an diese binden (Repoila & Darfeuille, 2009).

Im Gegensatz zu den *trans*-kodierten sRNAs agieren Riboswitche überwiegend auf der *cis*-Ebene. Sie kommen hauptsächlich in den nicht translatierten Bereichen von Prokaryoten vor, sind jedoch auch an der Kontrolle des alternativen Spleißens in Eukaryoten beteiligt (Breaker, 2012). Es handelt sich bei Riboswitchen um strukturierte RNA-Elemente, die aufgrund ihrer flexiblen dreidimensionalen Struktur zur Bindung spezifischer Liganden befähigt sind, wobei sie dieses Bindeereignis gleichzeitig zur Steuerung der Genexpression verwenden. Somit

sind in einem RNA-Molekül gleichzeitig die Sensor- und Regulatorfunktion vereint. Die Möglichkeit, durch *in vitro*-Selektionen neue Aptamer-Domänen zu generieren und diese in synthetische RNA-Schalter zu implementieren, macht Riboswitche zu wichtigen Bauteilen im Werkzeugkasten der Synthetischen Biologie.

2.2 Aptamere

Im Jahr 1990 erfolgte die Identifizierung der ersten artifiziellen Aptamere, unter anderem durch Ellington und Szostak. Aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek isolierten sie spezifische, farbstoffbindende RNA-Moleküle und bezeichneten diese als Aptamere von lateinisch *aptus* = passend und griechisch *meros* = Teilchen, wortgetreu also als „passende Teilchen“ (Ellington & Szostak, 1990). Unabhängig davon beschrieben Tuerk und Gold zeitgleich die Anreicherung spezifischer Nukleinsäuresequenzen gegen die T4 DNA-Polymerase und benannten die Methode SELEX (Tuerk & Gold, 1990). Diese wird detailliert in Kapitel 2.3 beschrieben.

Erst über zehn Jahre danach wurde der Wissenschaft bewusst, dass Aptamere bereits wahrscheinlich seit Urzeiten von der Natur als sensorische Domänen in Riboswitchen genutzt werden. Der Aufbau und Funktion dieser natürlichen Riboswitche sowie ihrer synthetischen Abbilder wird in Kapitel 2.4 dargelegt.

2.2.1 Struktur und Funktionsweise von Aptameren

Generell kann man Aptamere als RNA- oder ssDNA-Oligonukleotide bezeichnen, welche durch Ausbildung komplexer dreidimensionaler Strukturen imstande sind, Liganden spezifisch und hochaffin zu binden.

Die molekularen Unterschiede im Aufbau von RNA und DNA haben einen direkten Einfluss auf die Ausbildung dieser flexiblen Tertiärstrukturen. Durch die Anwesenheit der Hydroxylgruppe am C2-Atom der Ribose liegen RNA-Helices im Gegensatz zu DNA-Doppelsträngen ausschließlich in der A-Konformation vor (Fohrer, *et al.*, 2006). Da RNA-Stränge neben den Watson-Crick-Interaktionen GC und AU auch nichtkanonische Paarungen wie GU (Wobble-Paarung), GG oder GA eingehen, ergibt sich eine Vielzahl an Sekundärstrukturen, welche wiederum die Ausbildung übergeordneter Tertiärstrukturen ermöglichen (Butcher & Pyle, 2011, Halder & Bhattacharyya, 2013). Zu den Sekundärstrukturelementen zählen Haarnadelschleifen (*hairpins*), interne Schleifen (*loops*), Ausbuchtungen (*bulges*) und Kreuzungen (*junctions*). Typische RNA-Tertiärstrukturen sind z.B. Pseudoknoten, Kissing-Komplexe, Tetraloop-Tetraloop-Rezeptoren und Interaktionen von Helices (koaxiales Helix-Stacking). Die Tertiärstrukturen können zusätzlich durch mono- und bivalente Kationen, welche an das polyanionische Rückgrat der RNA binden, stabilisiert werden (Shiman & Draper, 2000).

Zur Ausbildung der RNA-Ligandenkomplexe spielen neben der RNA-Topologie elektrostatische Wechselwirkungen, Stacking-Interaktionen sowie sekundäre und tertiäre Wasserstoffbrücken-

bindungen zwischen den funktionellen Gruppen der Liganden und den RNA-Basen eine entscheidende Rolle (Hermann & Patel, 2000). Die ausgebildeten Bindetaschen sind in der Lage, den Liganden nahezu einzukapseln, wie beim Streptomycinaptamer (Tereshko, *et al.*, 2003) oder spezifische Andockoberflächen bereitzustellen, wie im Fall des RNA-Aptamers gegen Cyanocobalamin (Sussman, *et al.*, 2000). Die jeweilige Strukturkompatibilität ermöglicht den Aptameren dabei in vielen Fällen eine hochselektive Diskriminierung zwischen eng verwandten Moleküle (Jenison, *et al.*, 1994) und Enantiomeren (Famulok, 1992, Geiger, *et al.*, 1996).

Die Zielstrukturen, gegen welche bereits erfolgreich Aptamere selektiert worden sind, sind äußerst vielfältig. Sie reichen von Metallionen (Ciesiolka, *et al.*, 1995) über kleine organische Moleküle wie Aminosäuren (Famulok, 1994), Kohlenhydrate (Jeong, *et al.*, 2001), Vitamine (Wilson, *et al.*, 1998), Koenzyme (Lorsch & Szostak, 1994) und über Peptide und Proteine bis hin zu Viren (Pan, *et al.*, 1995), Zellen (Meyer, *et al.*, 2011) oder gar ganzen Organismen (Homann & Goring, 1999). Umfassendere Listen über Liganden von Aptameren finden sich in diversen Übersichtsartikeln (Stoltenburg, *et al.*, 2007, Yingfu, *et al.*, 2009, McKeague & DeRosa, 2012).

2.2.2 Einsatzmöglichkeiten von Aptameren

In den 1990er Jahren erwachte das Bewusstsein, dass hochaffine Oligonukleotide gegen nahezu jede Zielstruktur selektiert werden können. Dieses Potential als molekulare Erkennungselemente rückte Aptamere zunehmend als ernsthafte Konkurrenten zu Antikörpern für therapeutische und diagnostische Anwendungen in den Fokus (Jayasena, 1999).

Ein entscheidender Vorteil von Aptameren liegt in ihrem Herstellungsprozess. Im Gegensatz zur Antikörpergewinnung können Aptamere *in vitro* – und somit ohne Tierversuche – selektiert und hergestellt werden. Zudem ermöglicht die *in vitro*-Selektion die Findung von Erkennungssequenzen für toxische Zielmoleküle. Bereits während des Selektionsprozesses kann das Bindeverhalten der Aptamere an die jeweiligen Bedingungen der Endanwendung angepasst werden (pH-Wert, Salzkonzentrationen, Temperatur). Die identifizierten Aptamere können anschließend durch chemische oder enzymatische Synthesen im großen Maßstab mit gleichbleibender Qualität und Reinheit produziert werden.

Ein weiterer Vorzug zu Antikörpern besteht in der Stabilität von Aptameren. Während erstere unter denaturierenden Bedingungen ihre Struktur irreversibel auflösen, können sich Nukleinsäuren nach einer Denaturierung bei optimalen Bedingungen wieder in die funktionale Form falten und die Ligandenbindung wiederherstellen. DNA-Aptamere weisen eine inhärent höhere Robustheit gegen Degradationen durch Nukleasen auf als RNA-Aptamere. Durch systematische Modifizierungen (z.B. Einbringung von 2'-Ribose-modifizierte Nukleotiden) kann die Stabilität und Nukleaseresistenz von RNA-Molekülen in menschlichen Seren oder Blut drastisch gesteigert werden (Lin, *et al.*, 1994, Mayer, 2009). Abschließend ist zu erwähnen,

dass Aptamere im Gegensatz zu Antikörpern nicht immunogen sind, was ihre Anwendung im therapeutischen Feld begünstigt (Keefe, *et al.*, 2010).

Die Einsatzmöglichkeiten von Aptameren sind vielfältig. Vor allem in der medizinischen Grundlagenforschung und im therapeutischen Bereich werden große Anwendungspotentiale vorausgesagt. Hier sollen Nukleinsäureaptamere die aufwendiger herzustellenden proteinbasierten Arzneistoffe ablösen und gezielt krankheitsrelevante Proteine und Enzyme inhibieren bzw. deren Aktivität modulieren. Ein prominentes Beispiel hierfür ist das 2004 zugelassene Pegaptanib (Macugen®). Dieses 27 nt-lange RNA-Aptamer bindet hochspezifisch an eine pathogene Variante des Wachstumsfaktors VEGF und verhindert somit das Andocken an den entsprechenden Rezeptor. Dies führt zur Wachstumshemmung von Blutgefäßen, welche an der Pathogenese der altersbedingten Makuladegeneration beteiligt sind (Ng, *et al.*, 2006). Beispiele für weitere therapeutisch eingesetzte Aptamere, welche sich bereits in der Zulassungsphase befinden, sind bei Santosh und Yadava aufgelistet (Santosh & Yadava, 2014).

Die Tatsache, dass mit der Ligandenbindung oft eine Konformationsänderung der Nukleinsäuren einhergeht, macht Aptamere zu idealen Rezeptorkomponenten in Biosensoren. Die Bindungsreaktion und damit korrelierte räumliche Änderung kann durch eine Kopplung der Aptamere an physikochemische Signalgeber messbar gemacht werden, zum Beispiel über optische (Kolorimetrie, Fluoreszenz, Chemilumineszenz) oder elektrochemische Ausgangssignale (Cho, *et al.*, 2009). Diese „Aptasensoren“ finden nicht nur in der medizinische Diagnostik (Ozalp, *et al.*, 2015), sondern auch in der Bioanalytik Anwendung (Iliuk, *et al.*, 2011), wo sie zur Überprüfung der Lebensmittelsicherheit (Amaya-González, *et al.*, 2013) oder für umweltanalytische Zwecke (Palchetti & Mascini, 2008) eingesetzt werden.

Im Fokus dieser Dissertation stehen RNA-Aptamere, welche als Sensorelemente zum Aufbau synthetischer genetischer Schalter in lebenden Organismen genutzt werden. Die molekulare Struktur, Konstruktion und Anwendung dieser „Riboswitche“ genannten RNA-Schalter wird ausführlich in Kapitel 2.4 beschrieben.

2.3 *In vitro*-Selektion von Aptameren (SELEX)

2.3.1 Prinzip

Das Akronym SELEX steht für **S**ystematic **E**volution of **L**igands by **EX**ponential enrichment (Tuerk & Gold, 1990) und umfasst alle *in vitro*-Selektions- und Amplifikationstechniken, die zur Anreicherung ligandenbindender Nukleinsäuren führen. Der evolutionsähnliche Aspekt spiegelt sich im Ablauf dieser Methode wieder: Von einer anfänglich sehr großen Anzahl diverser Nukleinsäuren bleiben durch repetitive Selektions- und Vermehrungsschritte („Auslese“) nur noch wenige, an das Selektionsregime „angepasste“ Sequenzen übrig.

Im Folgenden wird der Ablauf einer *in vitro*-Selektion zur Gewinnung von RNA-Aptameren beschrieben, wie er in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.

Den Ausgangspunkt jeder SELEX stellt eine kombinatorische Zufallsbibliothek von 10^{14} – 10^{15} RNA-Sequenzen dar, welche durch eine *in vitro*-Transkription eines chemisch synthetisierten DNA-Pools hergestellt wird (siehe Kapitel 2.3.2). Diese RNA-Bibliothek wird in einem geeigneten Puffersystem mit den immobilisierten Zielmolekülen inkubiert. Durch geeignete Separationsschritte (z.B. durch chromatographische oder magnetische Methoden) können die nicht bindenden von den ligandenspezifischen RNAs separiert und entfernt werden. Die Elution der verbleibenden bindenden RNA-Moleküle kann anschließend durch vier Prinzipien erfolgen: entweder unspezifisch (durch thermische oder chemische Denaturierung), durch Komplexbildung divalenter Kationen mit EDTA (Famulok & Szostak, 1992), durch Anlegen eines Salzgradienten (Tao & Frankel, 1996) oder mittels spezifischer Affinitätselution (Inkubation mit freiem Zielmolekül). Die RNA-Sequenzen werden über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und durch eine PCR amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte werden hierbei mit einem Promotor für die T7 RNA-Polymerase versehen, wodurch sie wieder in einen RNA-Pool für die folgende SELEX-Runde transkribiert werden können.

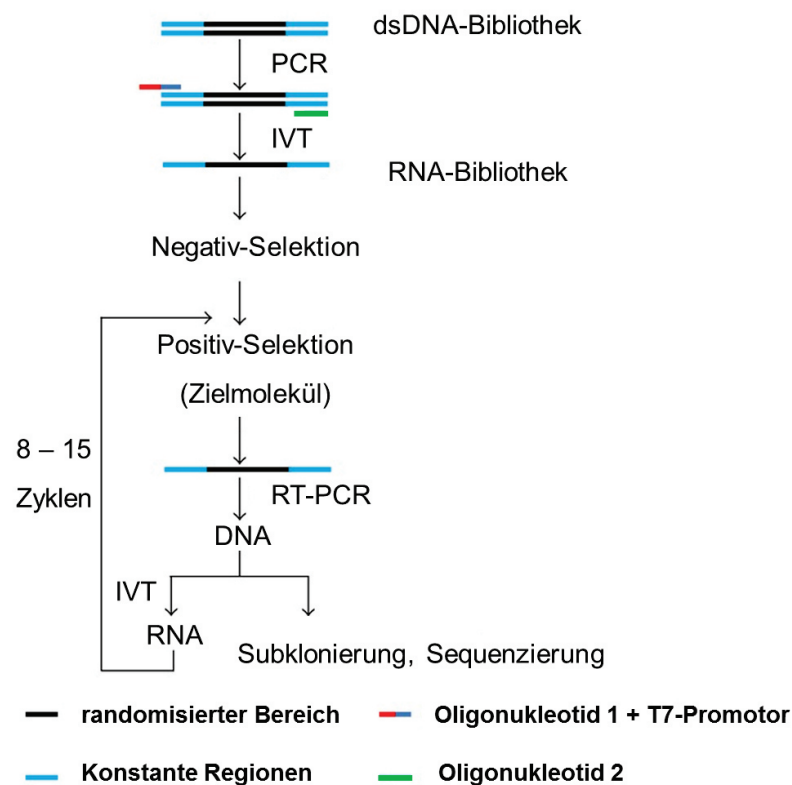


Abbildung 1: Schematische Darstellung der *in vitro*-Selektion zur Gewinnung von RNA-Aptameren. Die Durchführung wird im Fließtext beschrieben. PCR = Polymerase-Kettenreaktion; IVT = *in vitro*-Transkription; RT-PCR = Reverse Transkriptase-PCR. Modifiziert nach Santosh & Yadava. 2014..

Zur Vermeidung der Anreicherung unspezifischer Nukleinsäuren wird meist in der ersten SELEX-Runde eine Negativselektion gegen die entsprechende nicht derivatisierte Festphase durchgeführt. Eine Gegenselektion (engl. *counter selection*) wird hingegen angewendet, um die Spezifität der RNA-Bibliothek für das Zielmolekül gegenüber nah verwandten Strukturen zu steigern. Ein Beispiel hierfür ist das von Jenison 1994 selektierte Theophyllinaptamer (Jenison, *et al.*, 1994). Durch die Implementierung eines Gegenselektionsschrittes mit immobilisiertem Koffein weist das entsprechende Aptamer eine 10.000-fach bessere Bindung von Theophyllin gegenüber Koffein auf, welches sich lediglich durch eine Methylgruppe an der N7-Position des Purinringes unterscheidet (siehe Abb. 3, Seite 18).

Der SELEX-Prozess gilt als abgeschlossen, wenn sich die Affinität der RNA-Bibliothek gegenüber der Zielstruktur nicht mehr steigern lässt. Erfahrungsgemäß sind hierzu bei konventionellen SELEX-Methoden acht bis fünfzehn Runden vonnöten. Die angereicherte Bibliothek wird in Form der RT-PCR-Amplifikate in bakterielle Vektoren subkloniert, sodass individuelle Aptamere erhalten werden können.

Die bioinformatische Auswertung der individuellen Aptamersequenzen erfolgt hinsichtlich ihrer Primärstruktur (Größe, Nukleotidzusammensetzung) sowie durch Vergleiche von Sequenzabfolgen und Sekundärstrukturen untereinander. Dies dient dazu, konservierte Motive zu finden und die Einzelsequenzen in Familien zu gruppieren. In vielen Fällen repräsentieren die am häufigsten gefundenen Sequenzen funktionale Aptamere. Ebenso kann es aber auch der Fall sein, dass einzelne Aptamere (engl. *orphans*), welche keine Sequenz- und Strukturhomologie zu den restlichen Vertretern des angereicherten Pools aufweisen, die besten Bindeeigenschaften aufweisen (Yingfu, *et al.*, 2009). Ein Grund hierfür kann in einer Bevorzugung bzw. Benachteiligung von bestimmten Sequenzen während der Amplifikations-schritte liegen.

Die Bindeaffinitäten der individuellen Aptamere können durch verschiedene Messmethoden bestimmt werden, welche abhängig von der Art des Liganden gewählt werden müssen. Interaktionen von Aptameren mit großen Liganden (z.B. Proteinen) können durch einfache separationsbasierte Methoden analysiert werden, wie EMSA (Affinitätselektrophorese), Filter-Retentionen oder HPLC. Für niedermolekulare Verbindungen sind diese Verfahren nicht durchführbar, da die Bindungsreaktion keine messbare Größenänderung des Aptamer-Ligandenkomplexes hervorruft. Andere Methoden erfordern eine intrinsische Fluoreszenz oder Absorption der Liganden, bzw. eine Markierung derselbigen (bspw. für Thermophorese und Fluoreszenztitrationen). Jedoch kann diese chemische Modifizierung die RNA-Ligandeninteraktion behindern und somit die gemessenen Bindeaffinitäten verfälschen (McKeague & DeRosa, 2012). Gleiches gilt für Modifikationen zur Immobilisierung der Liganden an eine Trägoberfläche, wie für die SPR (Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie).

Eine markierungsfreie Messmethode für niedermolekulare Verbindungen, welche zudem keine Immobilisierung der Liganden erfordert, ist die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Diese

misst die freiwerdende oder einzusetzende Reaktionswärme bei Zustandekommen eines RNA-Ligandenkomplexes. Neben der Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante (K_a bzw. K_d) gibt diese Methode Aufschluss über die freie Enthalpie (ΔG), Reaktionsenthalpie (ΔH), Reaktionsentropie (ΔS) und die Stöchiometrie der Wechselwirkung (Salim & Feig, 2009).

2.3.2 Nukleinsäurebibliothek

Die Größe und Struktur der Ausgangsbibliothek kann einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der SELEX haben. Die Anzahl der randomisierten Nukleotide des Kernbereiches wird meist zwischen 30–70 gewählt, jedoch führten auch komplexere Bibliotheken von 120 nt (Sassanfar & Szostak, 1993) oder 134 nt (Seiwert, *et al.*, 2000) zur Selektion funktionaler Aptamere. Geht man von der in dieser Dissertation verwendeten Pool-Größe von 64 nt aus, so ergibt sich eine Anzahl von 4^{64} , also mehr als 10^{38} möglichen Sequenzen. Bei einer in der initialen Runde maximal einsetzbaren Stoffmenge von 0,1–10 nmol ($\sim 6 \cdot 10^{13} - 6 \cdot 10^{15}$ Sequenzen) wird deutlich, dass diese Komplexität nicht abgedeckt werden kann. Nichtsdestotrotz sind mit ebensolchen Bibliotheken erfolgreich funktionale Aptamere selektiert worden. Eine Erklärung kann darin liegen, dass in der Sekundärstruktur der Aptamere eine gewisse Variabilität der nicht direkt in der Bindung involvierten Nukleotide toleriert wird.

Neben ausschließlich randomisierten Anfangsbibliotheken werden auch jene verwendet, die über einen vorgegeben, teilstrukturierten Bereich verfügen. Davis und Szostak konnten zeigen, dass durch die Implementierung einer solchen teilstrukturierten Anfangsbibliothek (Vorgabe einer Stammschleife) die Selektion in Richtung komplexerer und ligandenaffinerer Aptamere gelenkt werden kann (Davis & Szostak, 2002). Dieser direkte Zusammenhang zwischen der strukturellen Komplexität bzw. dem Informationsgehalt von Aptameren zu ihrer Funktionalität wurde durch Carothers *et al.* bekräftigt (Carothers, *et al.*, 2004). Zudem stellten sie die Hypothese auf, dass die zufällige Verteilung von Sequenzen mit ihrer Komplexität in einer Zufallsbibliotheken abfällt, was durch bioinformatische Berechnungen gestützt wird (Gevertz, *et al.*, 2005). Somit können teilstrukturierte Anfangsbibliotheken einen guten Kompromiss zwischen kürzeren (informationsärmeren) und längeren (komplexeren aber statistisch schlechter abgedeckten) Zufallsbereichen darstellen.

Auch die zur Amplifikation benötigten flankierenden Bereiche können sich auf die Funktionalität der Aptamere auswirken, etwa durch ungewollte Interaktionen mit dem randomisierten Bereich. In anderen Fällen sind die konstanten Bereiche maßgeblich an der Aptamer-Ligandenbindung beteiligt, wodurch nachträgliche Verkürzungen am 5'- oder 3'-Ende oft zu einem Verlust der Funktionalität führen. Um den Einfluss der konstanten Bereiche zu minimieren, wurden zahlreiche „oligonukleotidfreie“ SELEX-Methoden entwickelt (Pan & Clawson, 2009).

2.3.3 SELEX gegen niedermolekulare Verbindungen

Small molecules, zu Deutsch niedermolekulare Verbindungen, stellen eine äußerst heterogene Gruppe von Stoffen mit niedriger Molekülmasse (bis ca. 800 g/mol) dar. Im pharmakologischen Bereich wird der Begriff zur Abgrenzung gegenüber den Biopharmazeutika genutzt, welche makromolekulare Arzneistoffe (Proteine und Nukleinsäuren) darstellen. Über 90% der gesamten vermarkteten Arzneistoffe sind hierbei den niedermolekularen Verbindungen zuzuordnen, was insbesondere ihrer guten Zell- und Gewebepерmeabilität zuzuschreiben ist (Lipinski, *et al.*, 2001).

Niedermolekulare Verbindungen können Botenstoffe, Kofaktoren, Metabolite, Pigmente oder Antibiotika sein, aber auch schädliche Substanzen wie Pestizide, Kanzerogene oder anderweitige Giftstoffe. Aufgrund der bedeutenden Rolle in biologischen Systemen, dem großen Anwendungsspektrum als Arzneimittel und den ökologischen Auswirkungen auf den Menschen besteht ein zunehmendes Interesse in der Nutzbarmachung, Detektion und Quantifizierung niedermolekularer Verbindungen. Für diese Anwendungszwecke stehen vermehrt Aptamere und die aus ihnen konstruierten Biosensoren im Fokus der Wissenschaft und Industrie. Trotz dieser Tatsache stellt nur bei jeder fünften Aptamerselektion eine niedermolekulare Substanz das Zielmolekül dar, wie Abbildung 2 verdeutlicht.

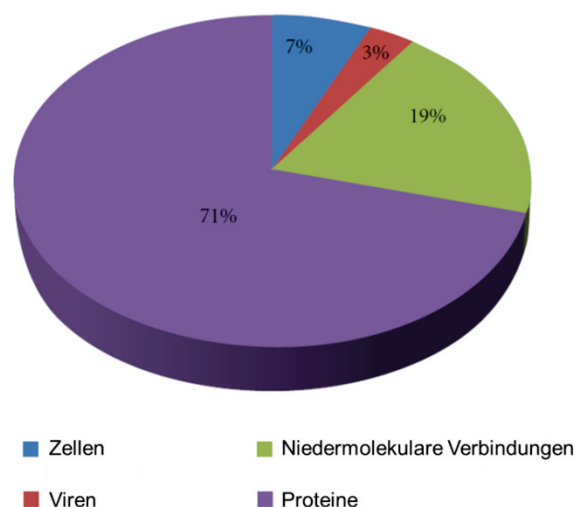


Abbildung 2: Übersicht der zwischen 1990 und 2011 selektierten Aptamere nach Ligandenklasse. Modifiziert nach McKeague & DeRosa. 2012.

Die deutlich größte Anzahl an erfolgreichen *in vitro*-Selektionen erfolgt(e) gegen Proteine. Diese stellen zum einen oftmals therapeutisch interessante Zielmoleküle dar. Zum anderen halten sie mit ihren großen, multifunktionellen Oberflächen eine Vielzahl an Bindeepitopen für Aptamere bereit, beispielsweise über die Seitenketten der basischen (kationischen) Aminosäuren Lysin oder Arginin.

Carothers *et al.* mutmaßten, dass es einen antiproportionalen Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht des Liganden zur Bindeaffinität des entsprechenden Aptamers gibt, ergo, dass größere Zielmoleküle zu niedrigeren Dissoziationskonstanten führen könnten (Carothers, *et al.*, 2010). Gleichzeitig spezifizierten sie diese Hypothese darin, dass nicht allein die Anzahl der Moleküle, sondern ebenso die Anordnung dieser ausschlaggebend sei. Die Erkennung/Bindung von niedermolekularen Stoffen durch Aptamere kann durch bestimmte funktionelle Gruppen begünstigt werden. Hierzu zählen in erster Linie Wasserstoffdonatoren und -akzeptoren zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Planare Ringsysteme erlauben Interaktionen durch Basenstapelungen (*base pair stacking*). Ebenso wird ein Zusammenhang mit der Flexibilität des Liganden gesehen. Starren Molekülen mit einer niedrigeren Anzahl an drehbaren Bindungen und somit weniger Freiheitsgraden wird eine bessere Interaktionsmöglichkeit mit Makromolekülen zugesprochen (Andrews, *et al.*, 1984). Folgend wird der Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und der Affinität von selektierten Aptameren für ausgesuchte Beispiele (Abb. 3) untersucht.

Zahlreiche Aptamerselektionen zielen auf Antibiotika als Liganden ab, da sie oftmals spezifisch mit Nukleinsäuren interagieren und zudem eine gute Zellpermeabilität in pro- und eukaryotische Zellen aufweisen.

Gegen Tetrazyklin wurden RNA-Aptamere mit einer Dissoziationskonstante von ca. 1 μM selektiert (Berens, *et al.*, 2001). Durch rationales Design und geeignete Verkürzungen konnten diese hinsichtlich ihrer Affinität sogar auf einen K_d -Wert von ca. 0,8 nM optimiert werden (Müller, *et al.*, 2006). Wie in Abbildung 3 ersichtlich ist, besitzt Tetrazyklin ein planares Grundgerüst, einen aromatischen Ring und viele hydrophile funktionale Gruppen. Diese molekulare Struktur ermöglicht sowohl ionische als auch hydrophobe Wechselwirkungen sowie Stacking-Interaktionen mit den Nukleinsäuren.

Gegen Aminoglykosid-Antibiotika, welche natürlicherweise an ribosomale RNA binden, wurden ebenfalls hochspezifische RNA-Aptamere mit K_d -Werten im nanomolaren Bereich selektiert. Weigand *et al.* konnten mithilfe eines *in vivo*-Screeningsystems in einem zuvor *in vitro*-angereicherten Pool ein Neomycinaptamer identifizieren, welches eine Dissoziationskonstante von 9 nM aufweist (Wallis, *et al.*, 1995, Weigand, *et al.*, 2011). Wie Abbildung 3 zeigt, sind Aminoglykoside nicht planar und besitzen eine Vielzahl drehbarer Bindungen. Jedoch besitzen sie viele primäre Amine zur Interaktion mit dem polyanionischen RNA-Rückgrat. Des Weiteren wurden hochaffine Aptamere gegen Tobramycin (Wang & Rando, 1995), Lividomycin (Lato, *et al.*, 1995), Kanamycin A (Lato, *et al.*, 1995), Kanamycin B (Kwon, *et al.*, 2001) und Streptomycin (Wallace & Schroeder, 1998) identifiziert.

Weitere Antibiotika, gegen welche *in vitro*-Selektionen durchgeführt wurden, sind Moenomycin (Schürer, *et al.*, 2001), Chloramphenicol (Burke, *et al.*, 1997), Viomycin (Wallis, *et al.*, 1997) und Ciprofloxacin (persönliche Kommunikation C. Bofill-Bosch).

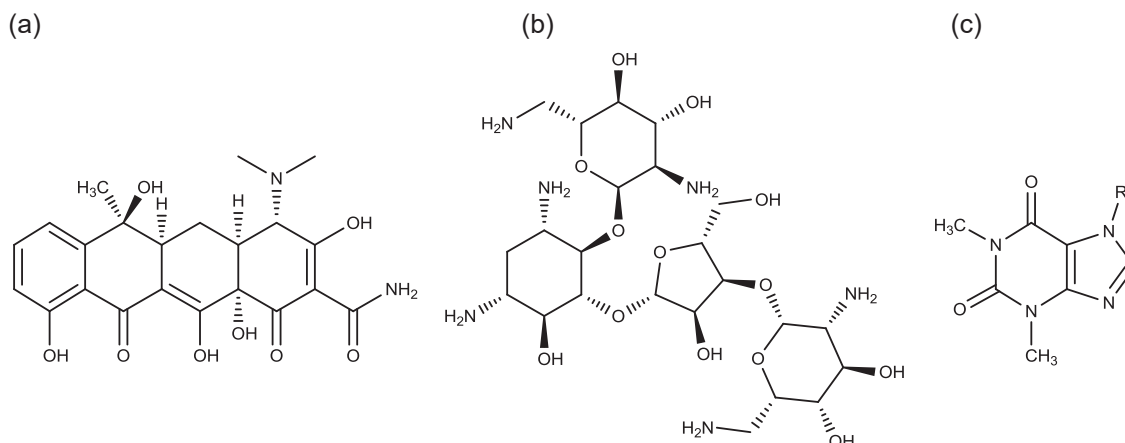


Abbildung 3: Niedermolekulare Verbindungen, gegen welche hochaffine RNA-Aptamere selektiert wurden. (a) Tetrazyklin. (b) Neomycin B. (c) Theophyllin R = H; Koffein R = CH₃.

Auch zahlreiche nicht antibiotische Stoffe waren Gegenstand einer SELEX, z.B. Nukleobasen und deren Abkömmlinge (Kiga, *et al.*, 1998, Koizumi & Breaker, 2000, Meli, *et al.*, 2002, Sazani, *et al.*, 2004), Kofaktoren (Burgstaller & Famulok, 1994, Saran, *et al.*, 2003), Aminosäuren (Famulok, 1994, Geiger, *et al.*, 1996, Majerfeld & Yarus, 1998) und Fluorophore (Holeman, *et al.*, 1998, Endo & Nakamura, 2010).

Besonders erwähnenswert ist das Purinalkaloid Theophyllin, welches als planares Molekül mit seinem RNA-Aptamer (Jenison, *et al.*, 1994) über Basenstapelungseffekte und Wasserstoffbrückenbindungen interagiert. Trotz des geringen Molekulargewichts von Theophyllin von lediglich 180 g/mol beträgt der K_d -Wert dieser Interaktion 100 nM und ist zudem hochselektiv.

Der kleinste organische Ligand, welcher in Aptameren natürlicher Riboswitche (siehe Kapitel 2.4.1) identifiziert wurde, ist die Aminosäure Glycin mit einem Molekulargewicht von 75 g/mol (Mandal, *et al.*, 2004). Die natürlichen Aptamere anderer, ähnlich kleiner Liganden wie Guanin (151,1 g/mol) oder preQ1 (180,2 g/mol) zeigen dabei erstaunlich spezifische Bindungen mit Dissoziationskonstanten von 5 nM (Mandal, *et al.*, 2003) bzw. 2 nM für preQ1 (Jenkins, *et al.*, 2011). Es ist denkbar, dass solche hohen Affinitäten theoretisch auch durch *in vitro*-Selektionen erreicht werden können. Jedoch steht die Wissenschaft einer Vielzahl von technischen Limitierungen gegenüber – insbesondere wenn niedermolekulare Verbindungen die Zielsubstanzen darstellen. Neben Problemen, welche die chemische Synthese, Löslichkeit und Stabilität betreffen, stellen hier insbesondere die Immobilisierung und die Bestimmung der Bindekonstanten eine große Herausforderung dar. Die Immobilisierung der Liganden an eine stationäre Phase ist die Voraussetzung für die Separation bindender von nicht bindenden Nukleinsäurespezies. Proteine können aufgrund ihrer Größen und Oberflächenfunktionalitäten einfacher an diverse Matrices (z.B. Nitrozellulosefilter) immobilisiert werden, ohne dass sich ihre chemische Struktur ändert. Bei der Immobilisierung niedermolekularer Verbindungen geht jedoch immer ein Teil der chemischen Information der Targets verloren, da eine/einige Gruppen zur Kopplung verwendet werden müssen. Sind keine geeigneten funktionellen Gruppen

vorhanden, müssen diese durch chemische Synthesen zusätzlich angebracht werden. Zudem ist meist eine komplizierte Kopplungschemie vonnöten, welche die Stabilität des Liganden beeinträchtigen kann. Die gleiche Problematik spiegelt sich in den Methoden zur Bindeaffinitätsbestimmung wider, welche ausführlich in Kapitel 2.3.1 beschrieben werden.

2.4 Riboswitche

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass durch einen evolutionsähnlichen Prozess gegen nahezu jedes Zielmolekül spezifisch bindende Nukleinsäuresequenzen selektiert werden können. Werstuck und Green konnten bereits im Jahr 1998 RNA-Aptamere zum Aufbau funktionaler Schalter nutzen, mit welchen sie die Genexpression in lebenden Zellen steuerten (Werstuck & Green, 1998). Durch die erstmalige Charakterisierung eines natürlichen Riboswitches konnte die Gruppe um Ronald R. Breaker 2002 beweisen, dass die Natur sich dieses simple Prinzip zunutze macht – möglicherweise bereits seit Milliarden von Jahren (Nahvi, *et al.*, 2002, Breaker, 2012). Mit der Identifizierung diverser natürlicher Riboswitchklassen, die auf unterschiedlichste Arten die Genexpression steuern, ging auch eine rasante Entwicklung immer neuer synthetischer RNA-Schalter einher.

2.4.1 Natürliche Riboswitche

2.4.1.1 Entdeckung

Schon vor Entdeckung der Riboswitche waren natürliche Mechanismen bekannt, bei denen bestimmte Stoffwechselzustände zu posttranskriptionellen Veränderungen der RNA-Struktur und -Zugänglichkeit führen und dadurch die Genexpression beeinflussen. Als Beispiel ist TRAP (*trp RNA-binding attenuation protein*) in *Bacillus subtilis* zu nennen, welches die Tryptophanbiosynthese reguliert. Je nach vorliegender Tryptophankonzentration in der Zelle kann das Protein durch seine Bindung an die RNA eine Umstrukturierung dieser bedingen und somit zur Transkriptionstermination oder zur Inhibierung der Translationsinitiation führen (Babitzke & Gollnick, 2001). Auf dem gleichen Prinzip beruhen die T-Box-Module, nur dass hier anstelle von Proteinen unbeladene tRNA-Moleküle als Vermittler fungieren (Grundy & Henkin, 2003).

Im Gegensatz dazu benötigen Riboswitche keine zusätzlichen Sensormoleküle, wie Proteinfaktoren oder tRNAs. Diese RNA-Elemente können kleine Metabolite eigenständig erkennen und binden, wobei sie dieses Bindeereignis zugleich zur Steuerung der Genexpression verwenden. Der endgültige Beweis, dass Riboswitche tatsächlich Sensor- und Regulatorfunktionen ineinander vereinen, wurde durch proteinfreie Bindungstests mehrfach im Jahr 2002 erbracht: In diesem Jahr wurde die Funktion von Riboswitchen aufgeklärt, welche selektiv Adenosyl-Cobalamin (Nahvi, *et al.*, 2002), Thiaminpyrophosphat (TPP) und Flavinmononukleotid (FMN) erkennen (Mironov, *et al.*, 2002, Winkler, *et al.*, 2002). Heutzutage

sind mehr als 20 Riboswitchklassen bekannt, welche Aminosäuren, enzymatische Kofaktoren, Nukleobasen, aber auch inorganische Liganden binden (Lünse, *et al.*, 2013). Riboswitche wurden vornehmlich in nicht kodierenden Bereichen von prokaryotischen Genen identifiziert, jedoch sind TPP-Riboswitche auch bei Pflanzen und Pilzen verbreitet und steuern dort Spleißvorgänge (Wachter, 2010).

2.4.1.2 Aufbau und molekularer Wirkmechanismus

Riboswitche bestehen aus einer Sensordomäne (Aptamer) und einer Regulator-domäne (Expressionsplattform). Die hohe Affinität und Selektivität der natürlichen Aptamerdomänen im Vergleich zu ihren zuvor *in vitro*-selektierten Pendanten ist dabei besonders beachtlich. Beispielsweise kann das natürliche Guaninaptamer ($K_d = 5$ nM) (Mandal, *et al.*, 2003) seinen Liganden über 260-fach spezifischer erkennen als ein *in vitro*-selektiertes RNA-Aptamer (Kiga, *et al.*, 1998). Darüber hinaus werden die verwandten Purinderivate Hypoxanthin und Xanthin durch die Riboswitche stärker diskriminiert. Gleiches gilt für das FMN-Aptamer aus *B. subtilis* (Winkler, *et al.*, 2002), welches den Kofaktor 100-fach spezifischer bindet als das durch SELEX generierte Aptamer (Burgstaller & Famulok, 1994).

Die Bindung des Liganden führt zu einer strukturellen Änderung der Aptamerdomäne. Dieses Bindsignal wird an die direkt angeschlossene, nicht klar abgrenzbare Expressionsplattform weitergeleitet, welche ebenfalls eine Konformationsänderung erfährt und hierdurch die Expression der nachfolgenden Gene steuert. In Abbildung 4 werden Beispiele für verschiedenen Wirkmechanismen der Expressionsplattformen aufgezeigt. Am häufigsten sind dabei Mechanismen, welche die Transkription oder Translation beeinflussen. Transkriptionell regulierte Riboswitche bilden nach Bindung des Liganden einen Rho-unabhängigen Transkriptionsterminator aus (z.B. Guanin-Riboswitch *xpt*) oder lösen diesen auf, wie im Fall des durch Adenin aktivierten *ydhL*-Riboswitches in *B. subtilis* (Mandal & Breaker, 2004). Translationale Riboswitche steuern die Genexpression, indem sie die Zugänglichkeit der Shine-Dalgarno-Sequenz und des Startcodons regulieren. Diese werden nach Bindung des Liganden und einhergehender Umstrukturierung entweder maskiert, wie bei der S-Adenosylmethionin-gesteuerten S_{MK} -Box (Fuchs, *et al.*, 2006) oder freigeben, wie beim *addA*-Riboswitch für Adenin (Rieder, *et al.*, 2007). Seltener regulieren Riboswitche die Transkription und Translation simultan. Hier wird durch die Ausbildung des Transkriptionsterminatorstammes gleichzeitig die Ribosomenbindestelle maskiert (Vitreschak, *et al.*, 2002, Pedrolli, *et al.*, 2015). Der *lysC*-Riboswitch in *E. coli* ist ebenfalls ein dualer Riboswitch. Die Bindung von Lysin führt neben der Inhibierung der Translation gleichzeitig zum Abbau der mRNA durch Freilegung einer RNaseE-Schnittstelle (Caron, *et al.*, 2012).

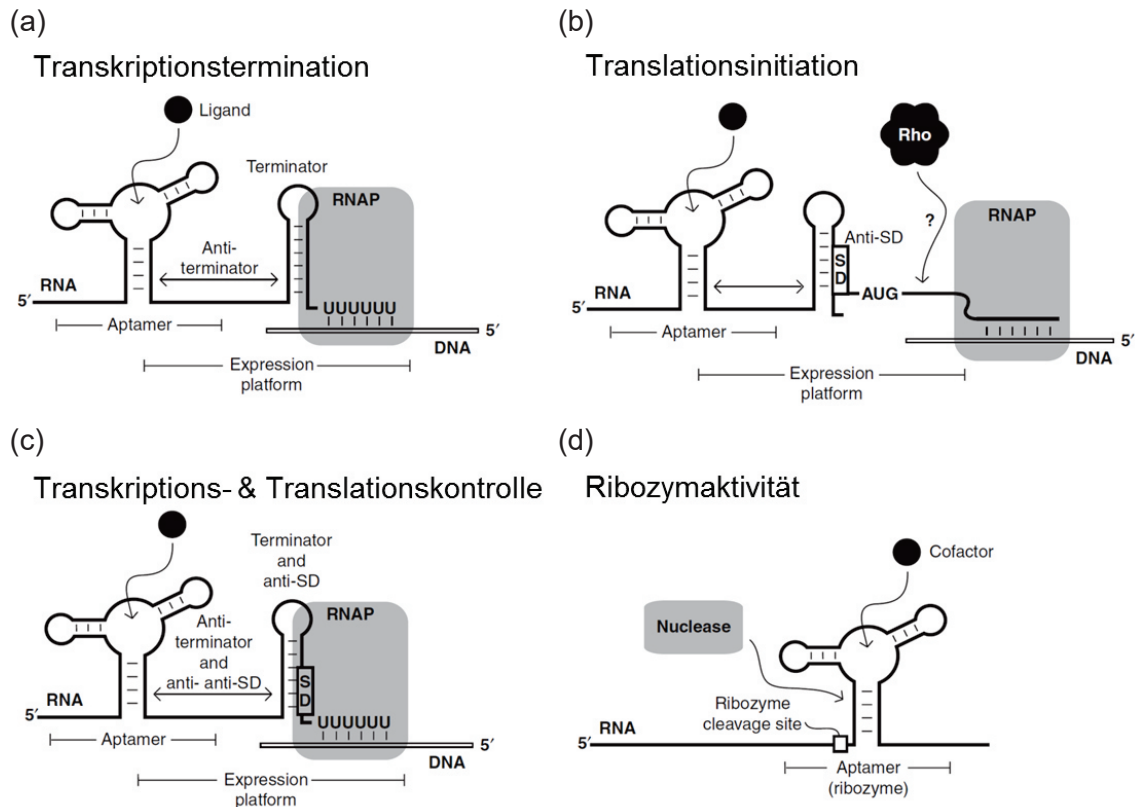


Abbildung 4: Ausgewählte Wirkmechanismen natürlicher bakterieller Riboswitches. (a) Rho-unabhängige Transkriptionstermination. (b) Inhibierung der Translationsinitiation. (c) Dualer Mechanismus aus Transkriptionstermination und Inhibierung der Translationsinitiation. (d) Allosterisch regulierte Ribozymaktivität. RNAP = RNA-Polymerase; SD = Shine-Dalgarno-Sequenz. Rho = Terminationsfaktor Rho. UUUUUU = Oligo-Uridin-Sequenz. AUG = Startcodon. Modifiziert nach Breaker, 2012..

Einen der vielleicht interessantesten Mechanismen stellt der *glms*-Riboswitch aus *B. subtilis* dar (Winkler, *et al.*, 2004). Bei diesem führt die Bindung des Liganden Glucosamin-6-Phosphat (GlcN6P) zu einer Selbstspaltung durch ein Ribozym, nach welcher die mRNA anschließend degradiert wird. Ribozyme sind katalytisch aktive RNAs, welche ebenso wie Enzyme chemische Reaktionen katalysieren können (Doherty & Doudna, 2000). Im nachfolgenden Kapitel wird dargestellt, wie man sich Riboswitch-Ribozymkonstrukte auch für synthetische RNA-Schalter zunutze machen kann.

2.4.2 Synthetische Riboswitches

Es werden stetig neue natürliche Riboswitchklassen und Regulationsmechanismen entdeckt. Auch das Dogma, das Riboswitches ausschließlich *cis*-regulatorische Elemente darstellen, wurde längst durch die Entdeckung von Schaltern überholt, welche *trans*-agierende sRNAs oder asRNAs (*antisense* RNAs) steuern (Mellin & Cossart, 2015).

In der Synthetischen Biologie werden neue RNA-Schalter nach diesen natürlichen Vorbildern konstruiert. Jedoch kommen auch neuartige Designstrategien von Riboswitchen hinzu, welche in der Natur (bisher noch) nicht entdeckt wurden.

2.4.2.1 Synthetische Riboswitche in Eukaryoten

Die ersten synthetischen Riboswitche wurden 1998 durch Werstuck und Green entworfen (Werstuck & Green, 1998). Mit dem Wissen, dass RNA-bindende Proteine ein Hindernis für den Scanning-Prozess der Ribosomen darstellen, inserierten sie RNA-Aptamere, welche Hoechst-Farbstoffe als Liganden binden, zwischen der *cap*-Struktur (Bindestelle des Ribosoms) und dem Startcodon der Translation. Tatsächlich konnten sie eine Repression der Translation eines Reportergens durch diesen Komplex beobachten (siehe Abb. 5a). Auf die gleiche Weise wurden konditionale Genexpressionssysteme mit dem Theophyllin- und dem Biotinaptamer (Harvey, *et al.*, 2002) sowie dem Tetrazyklinaptamer konstruiert (Suess, *et al.*, 2003). Oftmals sind *in vitro*-selektierte Aptamere jedoch trotz hoher Affinitäten nicht imstande, eine Regulation *in vivo* zu bewirken. Im Fall von neomycinbindenden Aptameren konnte mittels eines Screenings in *S. cerevisiae* eindrucksvoll gezeigt werden, dass nur wenige Sequenzen innerhalb eines durch SELEX angereicherten Pools als Schaltelemente eingesetzt werden können (Weigand, *et al.*, 2008). Nur Aptamere, welche im ungebundenen Zustand wenig strukturiert sind, jedoch nach Ligandenbindung eine starke Konformationsänderung erfahren, sind auch in der Lage, die Translation neomycinabhängig zu regulieren. Die Tatsache, dass viele Aptamere bereits in der Abwesenheit des Liganden eine vorgeformte, stabile Tertiärstruktur aufweisen, limitiert ihren Einsatz als Riboswitche und macht *in vivo*-Screenings von *in vitro*-angereicherten Pools nahezu unumgänglich (Berens & Suess, 2014, Berens, *et al.*, 2015).

Neben der Kontrolle der Translation werden Aptamere auch zur Kontrolle des Spleißvorganges eingesetzt. So konnten durch die Einbringung eines Theophyllinaptamers die Zugänglichkeit der 3'-Spleißstelle (Kim, *et al.*, 2005) bzw. durch ein Tetrazyklinaptamer die 5'-Spleißstelle reguliert werden (Weigand & Suess, 2007). Wie in Abbildung 5b zu sehen ist, verhindert dabei die ligandengebundene Form des Aptamers die Erkennung der Spleißstellen.

Die eukaryotische Genexpression kann auch über die Stabilität der mRNA mittels allosterischer, selbstspaltender Ribozyme gesteuert werden. Zuerst wurde dieser Ansatz im Labor von Ronald R. Breaker verfolgt. Dabei wurde die katalytische Aktivität eines Hammerhead-Ribozyms allosterisch durch den Bindungszustand des gekoppelten ATP-Aptamers reguliert (Tang & Breaker, 1997). Das verwendete Minimalkonstrukt des Hammerhead-Ribozyms ließ jedoch nur eine Aktivität *in vitro*, nicht aber *in vivo* zu. Erst Yen *et al.* konnten unter Gebrauch eines vollständigen Hammerhead-Ribozyms die Funktionalität dieses Mechanismus *in vivo* zeigen (Yen, *et al.*, 2004). Die Aktivität dieses Ribozyms konnte unter anderem auch tetrazyklinabhängig in HeLa-Zellen gesteuert werden (Beilstein, *et al.*, 2014).

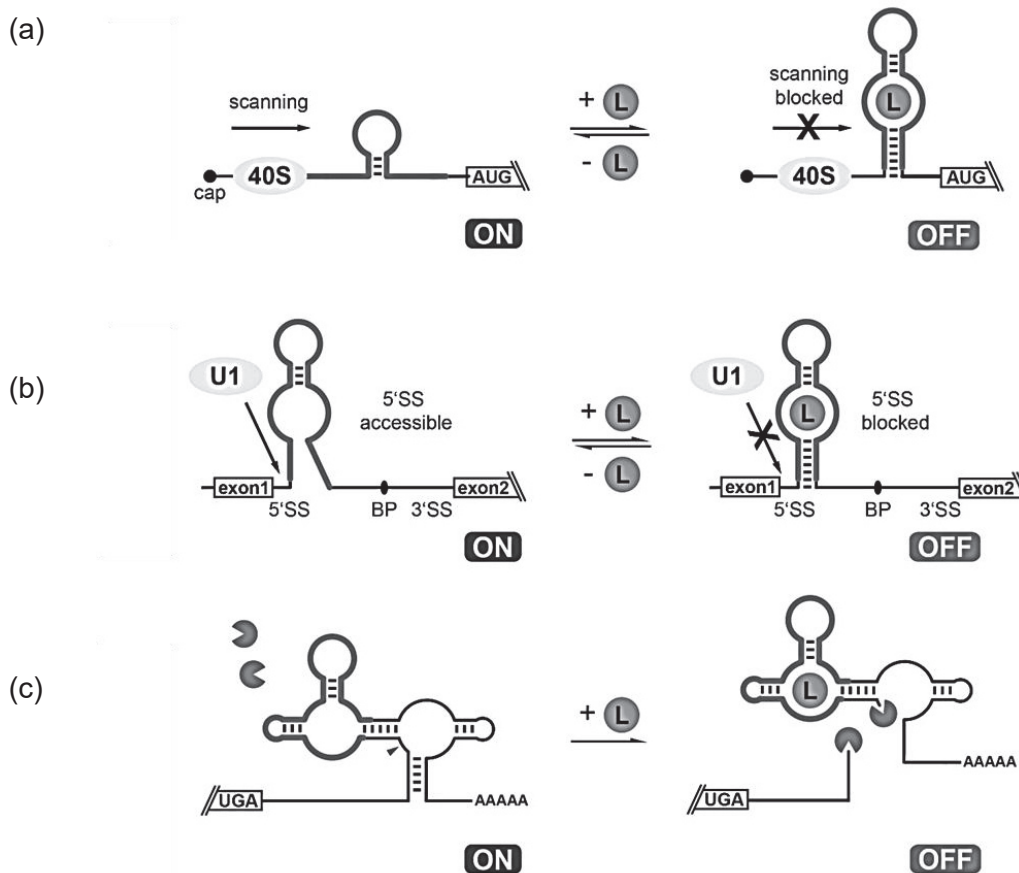


Abbildung 5: Ausgewählte Wirkmechanismen synthetischer Riboswitche für eukaryotische Systeme. (a) Regulation der Translation durch Inhibierung des ribosomalen Scannings. (b) Regulation des Spleißens der mRNA. SS = Spleißstelle. BP = Verzweigungspunkt (c) Einsatz allosterisch regulierter Ribozyme. Modifiziert nach Berens *et al.*, 2015.

Neben den aufgezeigten Methoden zur konditionalen Genexpression in Eukaryoten werden stets neue Riboswitchmechanismen entwickelt, die etwa die RNA-Interferenz (RNAi), das ribosomale „Shunting“ oder die Translationsinitiation durch IRES-Elemente ausnutzen. Hierzu wird auf den umfangreichen Übersichtsartikel von Groher und Suess verwiesen (Groher & Suess, 2014).

2.4.2.2 Synthetische Riboswitche in Prokaryoten

Zur Konstruktion synthetischer Riboswitche in Bakterien werden zumeist die natürlichen Mechanismen der Translations- und Transkriptionsregulation (Kapitel 2.4.1.2) als Vorbild genommen, wobei neuartige Aptamerdomänen implementiert werden. Besonders häufig wird dabei Theophyllin als Ligand verwendet, da dieses Molekül im Gegensatz zu Tetrazyklin und Neomycin nicht antibiotisch wirksam ist.

Der erste bakterielle synthetische Riboswitch wurde im Jahr 2004 für *B. subtilis* entworfen (Suess, *et al.*, 2004). Hier wurde das theophyllinbindende Aptamer an ein helikales Kommunikationsmodul (Soukup & Breaker, 1999) gekoppelt. Dieses Konstrukt wurde in die unmittelbare Nähe der Ribosomenbindestelle eines β -Galaktosidasereportergens platziert. In dieser Konformation behindert diese Stammschleifenstruktur die Anlagerung des Ribosoms. Die Bindung von Theophyllin bewirkt eine Verschiebung der Lage des helikalen Moduls um ein Basenpaar („*helix slipping*“), wodurch der Translationsstart nun für das Ribosom zugänglich ist und die Reportergenexpression stattfinden kann.

Auch die Gruppe um Justin P. Gallivan entwarf Riboswitche, durch welche die Translationsinitiation abhängig von Theophyllin steuerbar ist (Desai & Gallivan, 2004). Wie Abbildung 6 zeigt, werden die Shine-Dalgarno-Sequenz sowie das Startcodon AUG durch direkte Basenpaarungsinteraktionen mit dem Aptamer maskiert. Nur nach Bindung von Theophyllin und einer einhergehenden Umstrukturierung liegt die Translationsinitiationsregion wieder einzelsträngig vor und kann durch die anti-Shine-Dalgarno-Sequenz der 16S rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit erkannt werden. Durch rationale Designstrategien und zellbasierte Screenings (Lynch, *et al.*, 2007, Topp & Gallivan, 2008) konnten insgesamt sechs Riboswitchkonstrukte entwickelt werden, welche die Genexpression in Gram-positiven und -negativen Bakterien steuern können (Topp, *et al.*, 2010).

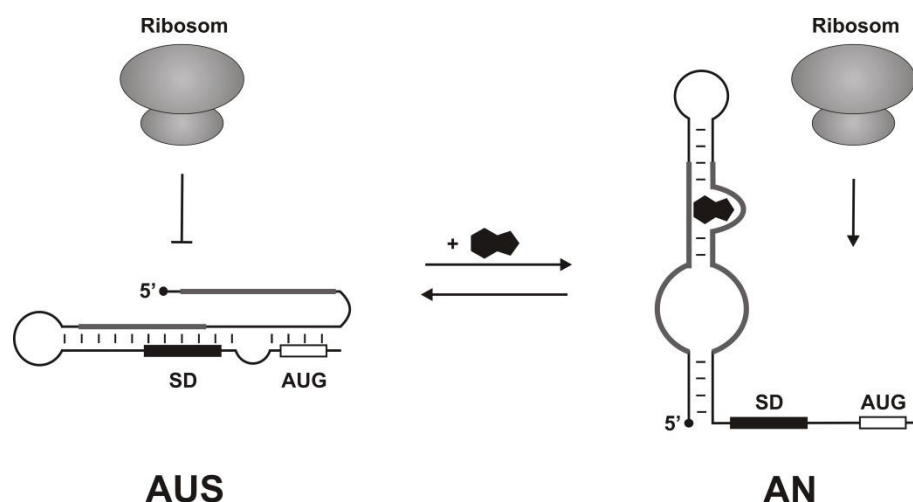


Abbildung 6: Regulation der Translationsinitiation durch einen synthetischen theophyllin-abhängigen Riboswitch. SD = Shine-Dalgarno-Sequenz.

Im Gegensatz zu diesen beiden translationalen Schaltern wurde das Theophyllinaptamer im Labor von Mario Mörl zum *de novo*-Design eines transkriptionellen Riboswitches in *E. coli* verwendet (Wachsmuth, *et al.*, 2013). Gestützt durch bioinformatische Berechnungen generierten sie einen Anhalter, bei dem sich ein klassischer Rho-unabhängiger Transkriptionsterminator in der Abwesenheit von Theophyllin ausbildet und erst durch Ligandenzugabe umstrukturiert und dadurch aufgelöst wird.

Ceres *et al.* umgingen diese Neukonstruktion von Riboswitchen (Ceres, *et al.*, 2013). Stattdessen nutzten sie Expressionsplattformen natürlicher Riboswitches und koppelten diese mit diversen Aptamerdomänen zu funktionalen Riboswitchchimären. Dabei verwendeten sie sowohl natürlich vorkommende als auch *in vitro*-selektierte Aptamere, wie solche gegen SAM, Lysin, Guanin bzw. Theophyllin und Tetrazyklin.

Auch synthetische *trans*-regulierende Riboswitches konnten unter Verwendung des Theophyllinaptamers konstruiert werden. So fusionierten Qi *et al.* dieses Aptamer mit einer Domäne einer nicht kodierenden RNA (Qi, *et al.*, 2012). Die Bindung des Liganden führte hierbei zur Auflösung eines Pseudoknotens, wodurch die ncRNA freigegeben wurde und zur Repression der Zielgene führte. Solche und weitere unter dem Namen „Riboregulatoren“ zusammengefasste RNA-Elemente können in synthetisch biologischen Ansätzen zum Aufbau komplexer genetischer Schaltkreise herangezogen werden.

2.5 Entwicklung photoschaltbarer Riboswitches

2.5.1 Photochromie

Der Begriff Photochromie wurde von Hirshberg im Jahr 1950 geprägt und bezeichnet laut Wortherkunft die lichtinduzierte Färbung und Entfärbung gelöster Verbindungen. IUPAC-Empfehlungen definieren Photochromie als „reversible Umwandlung einer chemischen Spezies zwischen zwei Formen A und B mit verschiedenen Absorptionsspektren, die in einer oder in beide Richtungen durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung ausgelöst wird“ (Dürr, 2004). Photochromie ist nicht allein auf farbige Stoffe beschränkt, sondern auf alle Systeme, welche eine Absorption im UV bis IR-Bereich aufzeigen. Die Rückreaktion kann sowohl thermisch (T-Typ) als auch photochemisch (P-Typ) erfolgen. Da mit den spektroskopischen auch Änderungen der physikalischen Eigenschaften einhergehen und sich das System durch eine Reversibilität auszeichnet, ist der Begriff „Photoschalter“ gebräuchlich.

Organische photochrome Systeme lassen sich in zwei Klassen einteilen. Azobenzole, Stilbene und Hemithioindigos gehören zu den Photoschaltern, bei denen eine Isomerisierungsreaktion von Doppelbindungen stattfindet (siehe Abb. 7a–b). Dies hat jeweils eine sterische Änderung zur Folge. Zum zweiten Reaktionstyp zählen Spiropyrane, Fulgimide und Diarylethene (Abb. 7c–e), welche eine elektrozyklische Ringschluss- bzw. Ringöffnungsreaktionen durchlaufen (Brieke, *et al.*, 2012)

Azobenzole stellen die am besten charakterisierte und am meisten eingesetzte Klasse von Photoschaltern dar. Das Grundgerüst des Azobenzols besteht aus zwei Phenylringen, die durch eine Azogruppe, also zweifach gebundene Stickstoffatome ($-N=N-$), miteinander verbunden sind. Im *trans*-Zustand befinden sich die Phenylringe auf gegenüberliegenden Seiten der Azogruppe, das Isomer ist dabei planar. Im *cis*-Zustand sind die Phenylringe um ca. 55°C

zueinander geneigt (Beharry & Woolley, 2011). Das *trans*-Isomer wird durch UV-Licht von ca. 350 nm in die *cis*-Form überführt, jedoch wird aufgrund einer Überlagerung der UV/VIS-Spektren ein photostationärer Zustand mit maximal 80% *cis* erreicht (Brieke, et al., 2012). Die Photoisomerisierung von *cis* zu *trans* findet durch Bestrahlung mit 450 nm statt, kann aber auch thermisch erfolgen, wobei 99,99% des *trans*-Isomers erhalten werden können. Von Samanta et al. wurden außerdem Azobenzolderivate synthetisiert, welche mit Licht im langwelligen Spektralbereich isomerisiert werden können (Samanta, et al., 2013), was insbesondere für biologische Anwendungen von großem Interesse ist (siehe Kapitel 2.5.3). Das Azobenzolgerüst kann an beiden Phenylringen chemisch modifiziert werden, wobei die Substituenten einen entscheidenden Einfluss auf die Isomerisierungswellenlängen und die Stabilität der beiden Zustände haben.

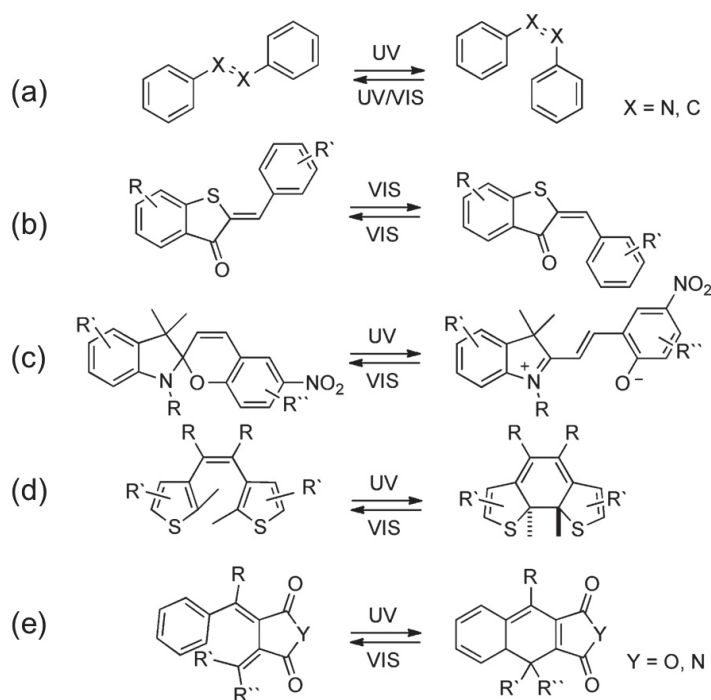


Abbildung 7: Grundstruktur photochromer Moleküle. (a) Azobenzol (X = N); Stilben (X = C). (b) Hemithioindigo. (c) Spiropyran. (d) Diarylethen. (e) Fulgimid (Y = N). Fulgid (Y = O). Abbildung aus Brieke et al., 2012.

Spiropyrane werden durch UV-Bestrahlung von der orthogonalen, farblosen Spiropyran- in die planare und farbige Merocyaninform überführt, was mit einer großen Änderung der Geometrie und des Dipolmomentes einhergeht (Brieke, et al., 2012, Özçoban, et al., 2015). Der Ringschluss erfolgt durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht oder sehr langsam durch thermische Prozesse. In den meisten Fällen stellt die Spiropyranform die thermisch stabilere Form dar, jedoch können bestimmte polare Substituenten das Merocyaninisomer thermisch begünstigen. Im Gegensatz zu Azobenzolen überlagern bei Spiropyranen die UV/VIS-Absorptionsbanden

nicht, was ein besseres Schaltverhalten zwischen der Spiro- und Merocyaninform erlaubt. Diese Eigenschaften machen Spiropyrane zu interessanten potentiellen Photoschaltern für biologische Anwendungen. Auch Diarylethene finden zunehmend Anwendung in der biochemischen Forschung. Diese Moleküle durchlaufen ebenfalls eine lichtabhängige, elektrozyklische Ringschluss-/Ringöffnungsreaktion und zeichnen sich in vielen Fällen durch eine sehr gute Reversibilität sowie durch eine hohe Ermüdungsresistenz aus (Irie, 2010).

Photochrome kleine Moleküle wurden bisher beispielsweise zur reversiblen Lichtregulation von Peptiden (Renner & Moroder, 2006, Hoppmann, *et al.*, 2009), Protein- und Enzymfunktionen (Volgraf, *et al.*, 2006, Schierling, *et al.*, 2010) sowie von DNA- und RNA-Oligonukleotiden (Asanuma, *et al.*, 1999, Ito, *et al.*, 2010) eingesetzt.

In dieser Dissertation soll auf die Interaktionsmöglichkeiten zwischen photochromen Molekülen mit RNA-Aptameren zur Entwicklung lichtschaltbarer Genregulatoren eingegangen werden.

2.5.2 Photoschaltbare Aptamer-Ligandenkomplexe

Bislang sind drei Studien bekannt, bei denen SELEX-Verfahren gegen photochrome Moleküle durchgeführt wurden (Lee, *et al.*, 2007, Young & Deiters, 2008, Hayashi, *et al.*, 2009). In allen Fällen war es das Ziel, die Bindung der Aptamere gegen nur eines der beiden Photoisomere zu richten. Hayashi *et al.* führten eine SELEX gegen das *trans*-Isomer des photoschaltbaren Peptids KRAzR (siehe Abb. 8a) durch (Hayashi, *et al.*, 2007, Hayashi, *et al.*, 2009). In SPR-Studien wiesen sie nach, dass einzelne Aptamerklone mit einer Dissoziationskonstante im hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich $K_{RAzR_{trans}}$ banden. Diese Bindung war zehnfach schlechter für die UV-belichtete $K_{RAzR_{cis}}$ -Form, konnte jedoch durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht von 430 nm (Überführung zurück zu $K_{RAzR_{trans}}$) vollständig wiederhergestellt werden. Young und Deiters konnten ebenfalls Photoisomer-spezifische RNA-Aptamere generieren, wobei sie gegen ein Spiropyranderivat (Abb. 8b) selektierten (Young & Deiters, 2008). Hierdurch konnten sie u.a. ein Aptamer identifizieren, welches eine 14-fache Diskriminierung der Spiropyranform gegenüber der UV-induzierten Merocyaninform zeigte. Die Affinität lag jedoch lediglich bei einem K_d -Wert von $\sim 10 \mu\text{M}$. Lee *et al.* erhielten in ihren Studien spezifische Aptamere gegen die geschlossene Form des Dihydropyrens BDHP-COOH, welches in Abbildung 8c gezeigt ist (Lee, *et al.*, 2007). Der beste Kandidat zeigte eine 35-fache Unterscheidung in seinem Bindeverhalten zwischen den jeweiligen Photoisomeren und einen K_d -Wert von $\sim 2 \mu\text{M}$.

Eine detaillierte Gegenüberstellung dieser photoschaltbaren Aptamer-Ligandenkomplexe zu den in dieser Arbeit selektierten Aptamere gegen Azobenzolderivate erfolgt im Diskussionsteil (siehe Kapitel 5.1.4)

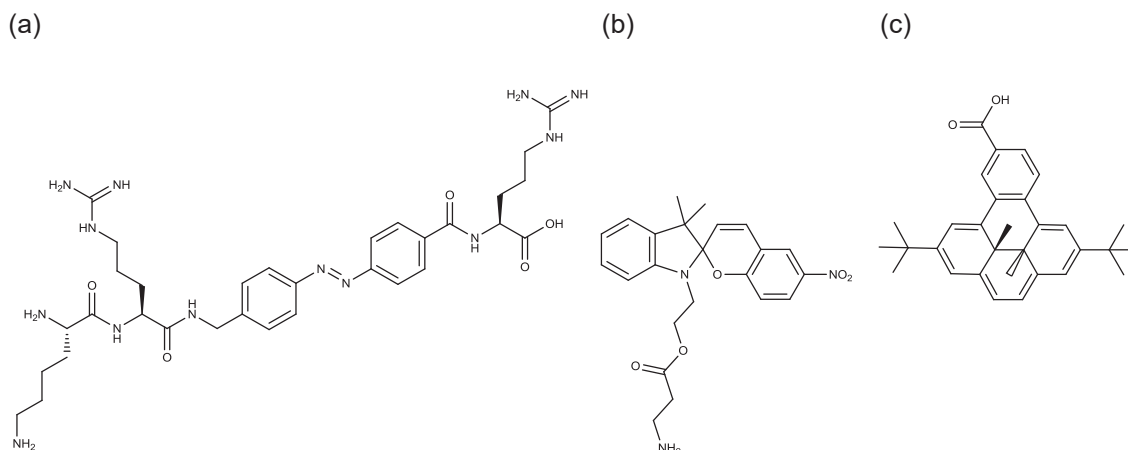


Abbildung 8: Chemische Strukturen der photochromen Moleküle, gegen welche *in vitro*-Selektionen durchgeführt wurden. (a) KRAzR, *trans*-Isomer (Hayashi, *et al.*, 2009). (b) Nitrospiropyrans, Spiropyranform (Young & Deiters, 2008). (c) BDHP-COOH, geschlossene Form (Lee, *et al.*, 2007).

2.5.3 Photoschaltbare Riboswitche

Licht ist ein ideales Werkzeug, welches ohne größeren technischen Aufwand räumlich, zeitlich und bezüglich seiner Intensität gesteuert werden kann. In biologischen Systemen ist Licht als externer orthogonaler Trigger einsetzbar, da (i) der Großteil der Zellen nicht auf Licht reagiert (mit Ausnahme von Photorezeptoren), (ii) es bei der Verwendung einer adäquaten Wellenlänge nicht zur Zellschädigung führt und (iii) viele Zellen und einige Organismen zumindest partiell lichtdurchlässig sind (Mayer & Heckel, 2006). Während bereits zahlreiche lichtgesteuerte Manipulationen von Enzymen, Ionenkanälen, Oligonukleotiden und weiteren Biomolekülen erprobt wurden (Brieke, *et al.*, 2012), ist bisher noch keine *in vivo*-Applikation von lichtabhängigen RNA-Schaltern publiziert. Auch sind in der Natur keine vorbildgebenden Mechanismen bekannt, bei denen Nukleinsäuren als Photorezeptoren agieren und dadurch die Genexpression regulieren (Jäschke, 2012).

Ein Bestreben der Synthetischen Biologie liegt in der *de novo*-Entwicklung von Riboswitchen, deren Funktion durch die Lichtqualität und -quantität reversibel moduliert wird. Ein mögliches Riboswitchdesign wird in Abbildung 9 gezeigt. Durch die Integration eines Aptamers in den 5'-UTR des Gens von Interesse wird der Scanning-Prozess der Ribosomen und somit die Translation in Anwesenheit eines photochromen Moleküls gehindert. Durch die Photoisomerisierung dissoziiert der Ligand von diesem Komplex und ermöglicht nun die Translationsinitiation. Die drei entwickelten photoschaltbaren Aptamer-Ligandenkomplexe, welche im vorhergehenden Kapitel beschrieben sind, fanden als Grundbausteine eines solchen *in vivo* RNA-Schalters bisweilen keine Anwendung. Die Gründe sind hierbei vor allem in den für biologische Systeme ungeeigneten Eigenschaften der Liganden zu sehen. Die Anforderungen an einen idealen Photoschalter, welcher in biologischen Systemen zur Steuerung der Genexpression eingesetzt werden kann, wird im Diskussionsteil im Kapitel 5.1.5 beschrieben.

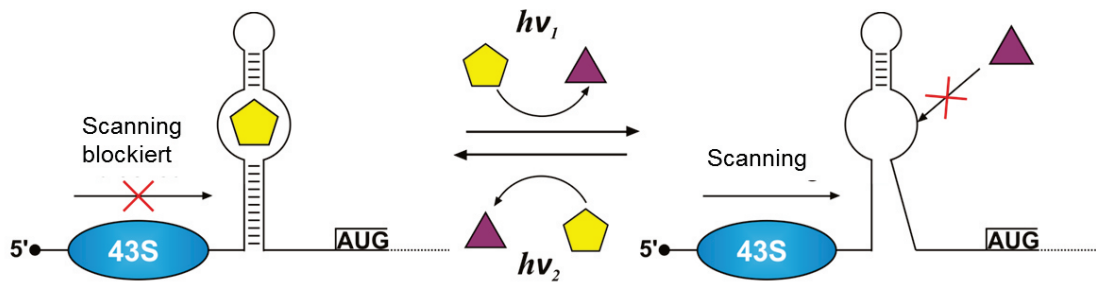


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines synthetischen lichtregulierten Riboswitches zur Steuerung der Translationsinitiation in Eukaryoten. $h\nu_1$ und $h\nu_2$ = Lichtenergie unterschiedlicher Wellenlängen. 43S = ribosomale Untereinheit/ Präinitiationskomplex. AUG = Startcodon des regulierten Gens.

2.6 Konditionale Genexpression in *Streptomyces coelicolor*

2.6.1 *S. coelicolor* als Modellorganismus der Actinomyceten

Der Begriff Actinomyceten umfasst Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* (innerhalb des Phylums *Actinobacteria*), welche sich durch eine Gram-positive Zellwand, einen hohen GC-Gehalt (69–73%) und ein pilzmyzelartiges Wachstum auszeichnen. Actinomyceten produzieren etwa zwei Drittel aller bekannten bioaktiven Substanzen mikrobiellen Ursprungs. Zu diesen zählen vordergründig Antibiotika, aber auch Antimykotika, Antihelminthika, Insektizide, Herbizide, Virostatika, Zytostatika und Immunsuppressiva (Watve, *et al.*, 2001, Bibb, 2013). Von den über 10.000 entdeckten biologisch aktiven Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten werden 74% durch die Gattung *Streptomyces* produziert (Bérdy, 2005).

Streptomyceten sind ubiquitär vorkommende Bakterien, welche sich durch eine überwiegend bodenbewohnende, saprophytische Lebensweise auszeichnen (Hodgson, 2000). Diese wird einerseits durch das vegetative Hyphenwachstum begünstigt, das durch seine filamentöse Morphologie eine effiziente Kolonisation von festen Bodensubstraten ermöglicht (Miguélez, *et al.*, 1992). Zum anderen können Streptomyceten durch Ausbildung von lange im Boden überdauernden Sporen ein semi-dormantes Stadium einlegen. Darüber hinaus sind Streptomyceten in der Lage, eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen zu sekretieren, um beispielsweise Chitin oder Cellulose abzubauen (Chater, *et al.*, 2010). Sie tragen damit zum ökologischen Gleichgewicht, insbesondere des Kohlenstoffkreislaufes, bei (McCarthy & Williams, 1992).

Der komplexe Lebenszyklus, die unvergleichbare Biosyntheseleistung wirtschaftlich bedeutsamer Naturstoffe, die ökologische Relevanz und die nahe Verwandtschaft zu Humanpathogenen (*Mycobacterium tuberculosis* oder *M. leprae*) rückten Streptomyceten in den Fokus der ersten bakteriellen Genomsequenzierungen. 2002 erfolgte die Sequenzierung des 8,66 Mb großen Genoms des genetisch und physiologisch am besten charakterisierten und als Modellorganismus der Actinomyceten angesehenen *S. coelicolor* A(3) (Bentley, *et al.*, 2002).

2.6.2 Charakterisierung von *S. coelicolor*

2.6.2.1 Morphologische Eigenschaften

S. coelicolor ist ein obligat aerob wachsendes, multizelluläres Bodenbakterium. Während seines sehr komplexen Lebenszyklus schnüren sich aus den multigenomischen Hyphen unigenomische Sporen ab, welche die Überdauerungsform darstellen (Chater, 1984, Claessen, *et al.*, 2006). Nach Germination der Sporen bilden sich ein oder mehrere Keimschläuche aus, deren Wachstum zunächst apikal stattfindet. Durch laterale Verzweigungen bildet sich ein geflechtartiges Substratmyzel, welches zunehmend durch Septen unterteilt wird. Nach einigen Tagen verdichtet sich das Myzel und nach Nährstoffeinlagerung an der Kolonieoberfläche sowie

einer teilweisen Lyse des Substratmyzels wird ein hydrophobes Luftmyzel ausgebildet (siehe Abb. 10). Diese Differenzierungsphase wird durch Raum- und Nährstofflimitation eingeleitet und durch eine Vielzahl komplexer biochemischer und genetischer Prozesse reguliert.

Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten steht in engem Zusammenhang mit dem morphologischen Differenzierungsgrad der Kolonien. Erst nach Ausbildung des Luftmyzels produziert *S. coelicolor* A2(3) unter anderem die Antibiotika Actinorhodin (pH-Wert-abhängige rote/blau Färbung) (Rudd & Hopwood, 1979), Undecylprodigiosin (rote Färbung) (Tsao, *et al.*, 1985), ein calciumabhängiges Peptidantibiotikum (Kempter, *et al.*, 1997) und Methylenomycin (Wright & Hopwood, 1976). Letzteres ist auf dem linearen Plasmid SCP1 kodiert, welches in dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm M145 nicht vorkommt.

Zur Ausbildung der Sporen differenzieren sich die zunächst apikal wachsenden Spitzen des multigenomischen Luftmyzels weiter aus, bis sie durch synchrone Zellteilungen in unigenomische Kompartimente abgeschnürt werden. Die Sporen besitzen eine verdickte Zellwand und sorgen durch die in sie eingelagerten Pigmente für das graue Erscheinungsbild älterer Kolonien.

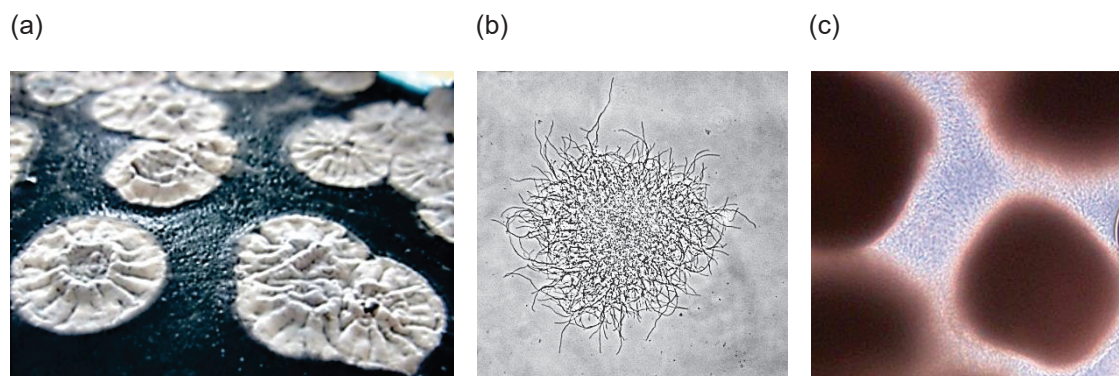


Abbildung 10: Koloniemorphologien von *S. coelicolor* M145 unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. (a) Ausbildung von weißem Luftmyzel auf SM-Agarplatten. Die Blaufärbung des Festnährbodens resultiert aus der Sekretion von Actinorhodin. (b) Lichtmikroskopische Aufnahme des primären Myzels während der Submerskultivierung in 3% TSB (400-fache Vergrößerung). (c) Lichtmikroskopische Aufnahme des sekundären Myzels während der Submerskultivierung in 3% TSB („Pellets“; 50-fache Vergrößerung). Die Photographien stammen vom Verfasser dieser Dissertation.

Bei der submersen Kultivierung (Flüssigkultur in Schüttelkolben oder Fermentern) bildet *S. coelicolor* weder ein Luftmyzel noch Sporen aus, produziert jedoch Sekundärmetabolite. Kennzeichnend für diese in der Industrie herkömmliche Kultivierungsform ist eine Zusammenlagerung der wachsenden Myzelgeflechte (primäres Myzel) zu unterschiedlich stark ausgeprägten Aggregationsformen (sekundäres Myzel, siehe Abb. 10c). Diese umgangssprachlich als Pellets bezeichneten Aggregationen zeichnen sich durch ein peripheres Wachstum und eine Substratlimitierung in den inneren Bereichen aus (Manteca, *et al.*, 2008).

Für *S. coelicolor* und verwandte, industriell relevante Arten konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart sowie die Morphologie solcher Pellets für die Produktionseffizienz von Sekundärmetaboliten von großer Wichtigkeit ist (Doull & Vining, 1989, Vecht-Lifshitz, *et al.*, 1992, Jonsbu, *et al.*, 2002, van Wezel, *et al.*, 2006).

2.6.2.2 Genom und Genregulation

Die Größe des Genoms von *S. coelicolor* spiegelt die morphologische und biosynthetische Komplexität dieses Bakteriums wieder. Die annähernd 8,7 Millionen Basenpaare kodieren für 7.825 Proteine (Bentley, *et al.*, 2002).

Die konditionale Genexpression, die für Wachstums- und Differenzierungsprozesse, aber auch zur spontanen Adaption an veränderte Umweltbedingungen und Stresssituationen erforderlich ist, findet auf mehreren Regulationsebenen statt. Viele dieser Prozesse werden durch Proteine vermittelt. So wird etwa die Promotorerkennung und somit die Transkriptionsinitiation durch Sigmafaktoren gesteuert. Während *E. coli* nur sieben verschiedene dieser RNA-Polymerase-bindenden Proteine kodiert (Sharma & Chatterji, 2010), enthält das Genom von *S. coelicolor* 65 Gene für Sigmafaktoren (Bentley, *et al.*, 2002).

Die Halbwertszeit der produzierten mRNAs kann durch Bindung von Proteinen oder durch den Abbau durch spezifische RNasen gesteuert werden. Die translatierten Proteine wiederum können selber in ihrer Struktur und somit Funktion modifiziert werden, z.B. durch Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung oder durch proteolytische Prozessierung (Hesketh, *et al.*, 2002).

Während jahrzehntelang nur Proteinen regulatorische Funktionen zugeschrieben wurden, sind in den letzten Jahren RNA-Moleküle, welche Gene steuern können, in den Fokus gerückt. Immer mehr *trans*- und *cis*-agierende RNAs wurden bekannt, welche metabolische Netzwerke, Zelldifferenzierungen, Anpassungen an Umweltänderungen und die Zellkommunikation regulieren können (Romby & Charpentier, 2010). Für *S. coelicolor* konnte gezeigt werden, dass kleine nicht kodierende RNAs (Vockenhuber & Suess, 2012, Moody, *et al.*, 2013, Vockenhuber, *et al.*, 2015) als auch Riboswitche (Borovok, *et al.*, 2006) eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuern.

2.6.3 Systeme zur konditionalen Genexpression in Streptomyceten

Eine gezielte und exakt regulierbare Kontrolle der Genexpression in Streptomyceten ist für wissenschaftliche und wirtschaftliche Zwecke gleichermaßen von großer Bedeutung. Mithilfe von zeitlich abgestimmten Induktions- bzw. Repressionsprofilen können Funktionen von Genen und Genprodukten aufgeklärt sowie Stoffwechsel- und Signalwege charakterisiert und manipuliert werden. Diese Studien können zudem das sog. „*genome mining*“ unterstützen: Durch zunehmende bioinformatische Analysen von mikrobiellen Genomen wurde deutlich, dass das Potential zur Produktion bioaktiver Naturstoffe – vor allem von Streptomyceten – noch nicht

ausgeschöpft ist. Für die Aktivierung kryptischer Biosynthesewege von unter Laborbedingungen stillen Genclustern könnten künstliche Überexpressionssysteme eine entscheidende Rolle spielen (Rebets, *et al.*, 2014). Selbst in *S. coelicolor* A3(2) sind die Genprodukte von über 30% der Biosynthesecluster noch unbekannt (van Keulen & Dyson, 2014).

In der biopharmazeutischen Industrie werden Streptomyceten neben der Synthese von Sekundärmetaboliten auch zur heterologen Proteinexpression eingesetzt – vor allem aufgrund ihrer Fähigkeit zur Sekretion der rekombinanten Proteine ins Kulturmedium (Anné, *et al.*, 2012). Eine Überexpression dieser Proteine bzw. Enzyme mit starken konstitutiven Promotoren kann zu einer erheblichen metabolischen Belastung des Produktionsorganismus führen. Dies wird insbesondere bei zelltoxischen Produkten ersichtlich. Für die Herstellung solche Stoffe ist die Wahl von induzierbaren Expressionssystemen unumgänglich.

Die für Streptomyceten verfügbaren Induktionssysteme wirken überwiegend auf der Ebene der Transkriptionsinitiation. Hierbei wird gegenwärtig der durch Thiostrepton induzierbare Promotor *ptipA* (Murakami, *et al.*, 1989) am meisten genutzt. Ein Nachteil dieses Induktionssystems ist, dass es der zusätzlichen Bereitstellung eines Aktivatorproteins und eines Thiostreptonresistenzgens bedarf (siehe Kapitel 5.2.2). Unter diesem Nachteil leidet auch ein gekoppeltes System aus *ptipA*/T7 RNA-Polymerase (Fischer, 1996, Lussier, *et al.*, 2010), dessen Komplexität die genetische Modifikation eines Expressionswirts zusätzlich erschwert. Weitere oft genutzte Expressionssysteme sind das Tetrazyklin-Repressor/Operatorsystem (Rodriguez-Garcia, *et al.*, 2005) und das P_{nitA} -NitR-System aus *Rhodococcus rhodochrous*, welches durch ϵ -Caprolactam induziert wird (Herai, *et al.*, 2004). Horbal *et al.* etablierten kürzlich zwei neue Repressor/Operatorsysteme, welche durch Cuminsäure und Resorcin induziert werden (Horbal, *et al.*, 2014). In einer Studie von Uguru *et al.* konnte gezeigt werden, dass mittels *trans*-agierenden *anti-sense* RNAs die Actinorhodinbiosynthese in *S. coelicolor* gesteuert werden konnte (Uguru, *et al.*, 2013). Jedoch wird zur Regulation dieser auch hier wiederum ein proteinbasiertes Induktionssystem vorausgesetzt.

Allen dargestellten Systemen zur konditionalen Genexpression ist gemein, dass sie der Bereitstellung zusätzlicher heterologer Proteinfaktoren bedürfen. Diese müssen oftmals zusätzlich in ihrer Codonzusammensetzung an die des Wirts angepasst werden (Wright & Bibb, 1992). Als Alternative zu diesen proteinbasierten Genexpressionssystemen soll in dieser Arbeit die Anwendbarkeit synthetischer theophyllinabhängiger Riboswitche (siehe Abschnitt 2.4.2.2) untersucht werden.

2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ein grundlegendes Anliegen dieser Arbeit ist es, wissenschaftliche Erkenntnisse über den Aufbau, die Entwicklung sowie die Verwendung synthetischer Riboswitche zu gewinnen.

Durch eine *in vitro*-Selektion (SELEX) sollen RNA-Aptamere identifiziert werden, welche nur ein Photoisomer eines Azobenzolderivates spezifisch binden können. Nach der Charakterisierung und Auswahl tatsächlich Photoisomer-spezifischer Aptamer-Ligandenkomplexe wird die Möglichkeit eruiert, diese RNA-Elemente zum Aufbau von lichtabhängigen Riboswitchen zu verwenden. Solch ein Riboswitch würde sich durch eine reversible sowie exakte räumliche und zeitliche Steuerung auszeichnen, was vielfältige Anwendungen, bspw. im entwicklungsbiologischen oder medizinischen Feld, zuließe.

Im zweiten Teil soll geprüft werden, ob synthetische theophyllinabhängige Riboswitche in der Lage sind, die Genexpression in *S. coelicolor* zu steuern und eine Alternative zu bereits vorhandenen proteinbasierten Induktionssystemen darstellen. Dabei sollen die Dynamikbereiche verschiedener Riboswitchkonstrukte in Kombination mit drei Promotoren bestimmt und evaluiert werden. Das Ziel ist es, robuste Riboswitche mit einem niedrigen basalen Expressionsniveau und einem gleichzeitig hohen Aktivierungsfaktor zu identifizieren. Darüber hinaus soll die Dosisabhängigkeit des Systems geprüft werden. Die identifizierten Riboswitchkonstrukte sollen dazu dienen, als modular kombinierbare und universell einsetzbare Elemente die Genexpression für native und heterologe Proteine in verschiedenen *Streptomyces*-Spezies zu steuern.

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Gerät	Hersteller
12-Tube Magnetic Separation Rack	New England Biolabs (USA)
96-Well Mikrotiterplatte, U-Bottom	Greiner Bio-One (Österreich)
Laborzentrifuge Microstar 17R	Thermo Electron Led GmbH (Osterode)
Brutschrank	Heraeus Christ (Osterode)
Electrophoresis Power Supply Consort	PeqLab (Erlangen)
Elektrophoresekammer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad (USA)
FastPrep [®] -24	MP Biomedicals (USA)
Feinwaage	Acculab (USA)
Fluorescent Image Analyzer FLA-500	Fujifilm (Japan)
Fluorolog-3 Spektrofluorometer	Horiba (Japan)
Geldokumentationsanlage	INTAS (Göttingen)
Glasfritte	Duran (Mainz)
Glasperlen (0.25–0.5 mm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Heizblock	VWR (Darmstadt)
Heizrührer MR Hei-Mix L	Heidolph (Schwabach)
Image Eraser SF	Molecular Dynamics (USA)
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG (Bottmingen)
LED LENSER [®] - T7	LED LENSER (Solingen)
Flüssigkeitsszintillationszähler 1409	Wallac (Monza)
Magnetrührer IKA RET basic	IKA (Staufen)
Membranfilter SUPOR 450, 0,45 µM	Pall Corporation (USA)
Bio-Spin [®] Chromatographiesäulen	Bio-Rad (USA)
MicroCal iTC200	GE Healthcare (UK)
MicroPulser Elektroporator	Bio-Rad (USA)
Mikroplatten-Reader Infinite 200 PR	Tecan (Schweiz)
Multifuge 1L-R	Heraeus Christ (Osterode)
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab (Erlangen)

pH-Meter 766 Calimatic	Knick (Berlin)
Phosphorimagerplatte (Storage Phosphor Screen), 20 x 23 cm	Fujifilm (Japan)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences (Konstanz)
Reinstwasseranlage MilliQ mit RNase-Filter	Milipore (Frankreich)
Standautoklav Tuttnauer 3870 ELV-3	Tuttnauer (Biomedis, Gießen)
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Taumelrollenmischer CAT-RM5	CAT M. Zipperer GmbH (Staufen)
Thermocycler peqSTAR 96 Universal	PeqLab (Erlangen)
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
ThermoStat plus	Eppendorf AG (Hamburg)
UV-Handlampe Nu-6 KL	Benda (Wiesloch)
UVLED 365	Fabrikat Bonn
Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Biochrom Ltd (UK)
Wasserbad WNB14	Memmert (Schwalbach)

3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Hersteller
[α - 32 P] UTP [3000 Ci/mmol]	Hartmann Analytics (Braunschweig)
[γ - 32 P] ATP [3000 Ci/mmol]	Hartmann Analytics (Braunschweig)
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Aceton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Affi-Gel 10	Bio-Rad (USA)
Agar	Oxoid (Heidelberg)
Agarose peqGold Universal	PeqLab (Erlangen)
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat ($(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Apramycinsulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Biotin-Fluoresceinkonjugat (FITC-Biotin)	Thermo Fisher (USA)
Borsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs (USA)
Bradford Reagenz (5x)	Bio-Rad (USA)

Bromphenolblau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Casamminosäuren	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Chloroform	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Cycloheximid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
D-(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
D-(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	PeqLab (Erlangen)
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dinatriumtetraborat Decahydrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dynabeads® M280 Streptavidin	Life Technologies (USA)
Eisen-II-sulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Eisen-III-Chlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol p.a.	Merck (Darmstadt)
Ethanolamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Fleischextrakt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Formamid, deionisiert	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Fosfomycin Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
GlycoBlue (15 mg/ml)	Invitrogen (USA)
Harnstoff	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Oxoid (Heidelberg)
Hefe-tRNA (10 mg/ml)	Life Technologies (USA)
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Isopropanol	VWR (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumsulfat (K_2SO_4)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Koffein	Fluka (Schweiz)

Kupfer-II-Chlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumacetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Mangan-II-Chlorid Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Mannitol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
MEM Aminosäuremix, Gibco (50x)	Life Technologies (USA)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nalidixinsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumazid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
n-Butanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Nukleosidtriphosphate (NTPs)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pepton aus Fleisch	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1 (PCI)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
p-Nitrophenyl- β -D-Glucuronid	Glycosynth (UK)
Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 40, 19:1)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
L-Prolin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Sojapulver, fettarm	Hensel (Schoenenberger, Magstadt)
Spermidin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Szintillationscocktail Rotiszint [®] eco plus	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Theophyllin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tryptic Soy Broth	Becton Dickenson (USA)
Trypton	Oxoid (Heidelberg)
Tween 20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
X-Gluc	X-Gluc Direct (UK)
Xylencyanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Yeast Nitrogen Base Difco	Becton Dickenson (USA)
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Tabelle 3: Liste der verwendeten Kitsysteme.

Kit	Hersteller
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher (USA)
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Life Technologies (USA)
MaxTract High Density (1,5; 2,0; 15 ml)	Qiagen (Hilden)
QIAfilter Plasmid Giga Kit	Qiagen (Hilden)
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Zymoclean [™] Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research (Freiburg)
Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit [™]	Zymo Research (Freiburg)

Tabelle 4: Liste der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
Taq-Polymerase [5 U/μl]	New England Biolabs (USA)
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase [2 U/μl]	New England Biolabs (USA)
SuperScript II Reverse Transkriptase [200 U/μl]	Life Technologies (USA)
T7 RNA-Polymerase [1,45 mg/ml]	Laboreigene Herstellung
Antarctic Phosphatase [5 U/μl]	New England Biolabs (USA)
T4 DNA-Ligase [400 U/μl]	NEW ENGLAND BIOLABS (USA)
T4 Polynukleotidkinase [10 U/μl]	New England Biolabs (USA)
DNase I (RNase-free) [2 U/μl]	New England Biolabs (USA)
RNasin [®] Plus RNase Inhibitor	Promega (USA)
Agel-HF [20 U/μl]	New England Biolabs (USA)
Acc65I [10 U/μl]	New England Biolabs (USA)
BglII [10 U/μl]	New England Biolabs (USA)
EcoRI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs (USA)
HindIII-HF [20 U/μl]	New England Biolabs (USA)
KpnI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs (USA)
NheI-HF [5 U/μl]	New England Biolabs (USA)
XbaI [15 U/μl]	New England Biolabs (USA)

Tabelle 5: Liste der verwendeten Größenstandards.

Größenstandard	Hersteller
peqGold Ultra Low Range DNA-Leiter II	PeqLab (Erlangen)
peqGOLD 1kb DNA-Leiter	PeqLab (Erlangen)
Low Range ssRNA Ladder	New England Biolabs (USA)

3.3 Medien und Puffer

Alle Medien, Stammlösungen und Puffer wurden nach der Herstellung für 20 min bei feuchter Hitze (121°C) und 2 bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden durch Filtration keimfrei gemacht. Das verwendete Wasser wurde über die Reinstwasseranlage MilliQ mit RNase-Filter aufbereitet (MQ-H₂O).

Tabelle 6: Liste der verwendeten Medien.

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
LB-Medium	Trypton	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
	± Agar	1,5% (w/v)
SOC-Medium	Trypton	2% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	0,05% (w/v)
	KCl	25 mM
	autoklavieren und anschließend steril hinzufügen:	
	MgCl ₂	10 mM
	Glucose	20 mM
TSB-Medium	Tryptic Soy Broth	3% (w/v)
SM-Medium	Sojapulver, fettarm	2% (w/v)
	Mannitol	2% (w/v)
	Agar	2% (w/v)
Minimalmedium (MM)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1% (w/v)
	K ₂ HPO ₄	0,05% (w/v)
	MgSO ₄	0,02% (w/v)
	FeSO ₄	0,001% (w/v)
	Agar	1% (w/v)
	auf 90% mit MQ-H ₂ O auffüllen, pH 7,2 einstellen und 10% (v/v) C-Quelle hinzugeben	

R2YE-Medium	Saccharose	10,3% (w/v)
	Glucose	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	K ₂ SO ₄	1,5 mM
	MgCl ₂	50 mM
	MOPS	100 mM
	Casaminosäuren	0,01% (w/v)
	Agar	2,2% (w/v)
	auf 956 ml mit MQ-H ₂ O auffüllen, autoklavieren und dann hinzugeben:	
	Spurenelemente-Lösung	200 µl
	KH ₂ PO ₄	4 mM
	CaCl ₂	25 mM
	L-Prolin	0,3 (w/v)
Spurenelemente-Lösung	ZnCl ₂	40 mg
	FeCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	10 mg
	(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg
	auf 100 ml mit MQ-H ₂ O auffüllen, steriltr filtrieren	
Soft Nutrient Agar (SNA)	Fleischextrakt	0,3% (w/v)
	Pepton aus Fleisch	0,5% (w/v)
	Agar	0,5% (w/v)
SCD-URA	Yeast Nitrogen Base	0,2% (w/v)
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,55% (w/v)
	Glucose	2% (w/v)
	Adenin	0,0012% (w/v)
	MEM Aminosäuremix, Gibco	20 ml/l
	Tris-HCl pH 8,0 (optional)	10 mM
	± Agar	1,5% (w/v)
	mit NaOH auf pH 5,6 einstellen; nur 10 min autoklavieren	

Tabelle 7: Liste der Antibiotika.

Antibiotikum	1000x Stammlösung (sterilfiltriert)
Ampicillin	100 mg/ml in MQ-H ₂ O
Apramycin	50 mg/ml in MQ-H ₂ O
Cycloheximid	80 mg/ml in 100% Ethanol
Fosfomycin	25 mg/ml in MQ-H ₂ O
Kanamycin	50 mg/ml in MQ-H ₂ O
Nalidixinsäure	25 mg/ml in 0,4 M NaOH

Tabelle 8: Liste der verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
10x TAE	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	1 mM
	pH 8,3	
10x TBE	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	10 mM
	pH 8,3	
10x PBS	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	81 mM
	KH ₂ PO ₄	18 mM
	mit NaOH auf pH 7,4 einstellen	
6x DNA-Ladepuffer	Tris-HCl pH 7,6	10 mM
	EDTA	60 mM
	Glycerin	60% (v/v)
	Bromphenolblau	0,03% (w/v)
	Xylencyanol	0,03% (w/v)
2x RNA-Ladepuffer	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)
	Xylencyanol	0,1% (w/v)
	in Formamid, deionisiert	

10x PCR-Puffer ohne MgCl_2	KCl	50 mM
	Tris-HCl pH 9,0	10 mM
	Triton X-100	0,1% (v/v)
2x-RT-PCR-Mix (SELEX)	10x PCR-Puffer ohne MgCl_2	1x
	5x First strand buffer (Invitrogen)	0,2x
	DTT	2 mM
	Oligonukleotid POOL-FWD	1 μM
	Oligonukleotid POOL-REV	1 μM
	MgCl_2	1,5 mM
	dNTP-Mix	0,3 mM
TK-Mix (SELEX)	Tris-HCl pH 8,0	200 mM
	DTT	5 mM
	NTP-Mix	je 2,5 mM
	MgCl_2	15 mM
T7-RNasin-Mix	T7 RNA-Polymerase	2 Vol.
	RNasin® Plus RNase Inhibitor	1 Vol.
PBS-Lagerungspuffer (Dynabeads®-SELEX)	PBS pH 7,4	1,25x
	BSA	1,25 mg/ml
PBS-Waschpuffer (Dynabeads®-SELEX)	PBS pH 7,4	1x
	MgCl_2	3 mM
5x SELEX-Puffer (Säulen-SELEX)	NaCl	1,25 M
	Tris-HCl pH 8,0	0,25 M
	MgCl_2	25 mM
Gus-Puffer	NaHPO_4 pH 7,0	50 mM
	Triton X-100	0,1% (v/v)
	DTT	5 mM

3.4 Oligonukleotide

Tabelle 9: Liste der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'–3')
pGus1	GTTGAGATCTTCCTGAGGCTAAAATTAGGATT
pGus2	GGGGTTTCGACGGGCGCAGACCGGTCATGTCCGTACCTCCGTTGC
pGus3	GCAACGGAGGTACGGACATGACCGGTCTGCGGCCCGTCGAAACCCC
pGus4	CGACTCTAGAGATAACAGGGTAATGCTTATCA
ermE-a	GATCTGTTGTGGGCTGGACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCCAGCGG
ermE-b	GTACCCGCTGGATCCTACCAACCGGCACGATTGTCCAGCCCACAACA
SF14-a	GATCTGACCTACGCCTTGACCTTGATGAGGCGGCGTGAGCTACAATC AATACTCG
SF14-b	GTACCGAGTATTGATTGTAGCTCACGCCGCCTCATCAAGGTCAAGGC GTAGGTCA
galP2-a	GATCTCTCCACCTGGAACTTTTCACTTCCGCCGTACGTCCGGCAAGCT GAAGTTCCTCGG
galP2-b	GTACCCGAGGAACCTTCAGCTTGCCGGACGTACGGCGGAAGTGAAAAG TTCCAGGTGGAGA
ribo-FWD-KpnI	TCATTAGGTACCAATACGACTCACTATAGGTTCCGGTGATACCAGC
ribo-REV-AgeI	GAGAGTCGTGTAAAATATCGAGACCGGTCATCTTGTTG
ribo-C-FWD-KpnI	ACAATTAGGTACCATACGACTCACTATAGGTTACTGATAAGATAGG
terminator1	CTAGACAACAAGAAGGAACCAGGGCCGCTT
terminator2	CAAGAGAAGCGGCCCTGGTTCCTTTCTTTT
terminator3	CCGCTTCTCTTGAAGCGGCCCTGGTTCCTTCTTGTGT
terminator4	CTAGTAAAAAAGAAAGAACCGGG
pG_Apta_FWD	TAGTTGCCACTGCTAGTAAAGCGATTCTC
POOL-FWD	GTATAATACGACTCACTATAGGGAGACGCAACTGAATGAA
POOL-REV	GTGACGCGACTAGTTACGGA
LacZ-REV	CGATTAAGTTGGGTAACGCC
pSP_FWD_NheI	ACACATGCTAGCTGTATAATACGACTCACTATAGGGAGACGCAACTG
pSP_REV_EcoRI	AAGTTCAGAATTCTGTGACGCGACTAGTTACGGA
pW_FWD_KpnI	AAATAAGGTACCTGTATAATACGACTCACTATAGGGAGACGCAACTG
pW_REV_HindIII	CTTTAAAAGCTTTGTGACGCGACTAGTTACGGA
34_Verkuerz_1a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGAACTGTGCAAAAGCAAAAATTCCG GCGTTCCTGC
34_Verkuerz_1b	ACGGATTCTACCCCTGTGTCGTGTTACGTCTCTGCCGAAGCAGGAAC GCCGAATTTTGC
34_Verkuerz_2a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGAACTGTGCAAAAGCAAAAATTCCG GCGT
34_Verkuerz_2b	ACGCCGAATTTTGTCTTTGCACAGTTCCTATAGTGAGTCGTATTATC TGG
34_Verkuerz_3a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGACGTAACACGACACAGGGGTAG AATCCGT

34_Verkuerz_3b	ACGGATTCTACCCCTGTGTCGTGTTACGTCCCTATAGTGAGTCGTATT ATCTGG
42_Verkuerz_1a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGCGGAAGTAGCACAGTTGACCCTA CTGCTTC
42_Verkuerz_1b	CGGAGCGGCTCCGTTACCTTTCCCGTAGGCCTGCCGAAGCAGTAGGG TCAACTGTG
42_Verkuerz_2a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGTTGACCCTACTGCTTCGGCAGGCC TACGGGAAAGGTAAC
42_Verkuerz_2b	GTTACCTTTCCCGTAGGCCTGCCGAAGCAGTAGGGTCAACCTATAGT GAGTCGTATTATCTGG
48_Verkuerz_1a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGAATGCCGGTGTTACATGGAAGAG CCACCCTGCTTC
48_Verkuerz_1b	TTACGGAACCGTAAGTCCCTAGGTTACGTGCGCTGCCGAAGCAGGG TGGCTCTTCCATG
48_Verkuerz_2a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGAATGCCGGTGTTACATGGAAGAG CCACCCTGCTTCGGCA
48_Verkuerz_2b	TGCCGAAGCAGGGTGGCTCTTCCATGTAACACCGGCATTCCCTATAGT GAGTCGTATTATCTGG
48_Verkuerz_3a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGACGTGAACCTAGGGACTTACGGT TCCGTAA
48_Verkuerz_3b	TTACGGAACCGTAAGTCCCTAGGTTACGTCCCTATAGTGAGTCGTAT TATCTGG
64_Verkuerz_1a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGACGTGAATTTCCGGCGTCTATCA GATCCGACCC
64_Verkuerz_1b	ACGGACTCACACCGAATTTCTTTTCATGCATTTGAACGGGTCGGATCT GATAGACGCC
64_Verkuerz_2a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGACGTGAATTTCCGGCGTCTA
64_Verkuerz_2b	CATGCATTTGAACGGGTCGGATCTGATAGACGCCGGAAATTCACGTC
64_Verkuerz_3a	CCAGATAATACGACTCACTATAGGGAAAAGAAATTCGGTGTGAGTCCG T
64_Verkuerz_3b	ACGGACTCACACCGAATTTCTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTATCTGG
MMR42V1+	CCGGTTGACCCTACTGCTTCGGCAGGCCTACGGGAAAGGTAACAAAA TGG
MMR42V1-	CTAGCCATTTTGTACCTTTCCCGTAGGCCTGCCGAAGCAGTAGGGTC AA
MMR42V2+	CCGGTGCACAGTTGACCCTACTGCTTCGGCAGGCCTACGGGAAAGGT AACGGAGCATACAAAATGG
MMR42V2-	CTAGCCATTTTGTATGCTCCGTTACCTTTCCCGTAGGCCTGCCGAAGC AGTAGGGTCAACTGTGCA
DbIA+	CCGGTTGACCCTACTGCTTCG
DbIA-	GTTGTTACCTTTCCCGTAGGCCTGCCGAAGCAGTAGGGTCAA
DbIB+	GCAGGCCTACGGGAAAGGTAACAACAACAAGTTGACCCTACTGCTTC GGCAGGCCTACGGGAAAGGTAACAAAATGG
DbIB-	CTAGCCATTTTGTACCTTTCCCGTAGGCCTGCCGAAGCAGTAGGGTC AACTTGTT
loopF	CCGGTTGACCCTACTGGTTTTCCAGGCCTACGGGAAAGGTAACAAAAT GG
loopR	CTAGCCATTTTGTACCTTTCCCGTAGGCCTGGAAAACCAAGTAGGGTC AA
pWHE601-seq	CCACTGACAGAAAATTTGTGCCC
pJET1.2R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

3.5 Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 10: Liste der verwendeten Bakterien- und Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K⁻, m_K⁺</i>) <i>phoA supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR recF143</i> <i>zjj201::Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5</i> <i>leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtli</i> <i>glnV44</i> ; enthält das nicht übertragbare, <i>oriT</i> - mobilisierende <i>Plasmid</i> pUZ8002	(Flett, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Streptomyces</i> <i>coelicolor</i> M145	SCP1-, SCP2-, prototroph	(Kieser, <i>et al.</i> , 2000)
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> RS453 α	MAT α <i>ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3 leu2-112</i> <i>his3-1 ura3-52</i>	(Sauer & Stadler, 1993)

3.6 Molekulargenetische Methoden

3.6.1 Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von wässrigen Nukleinsäurelösungen (dsDNA, ssDNA und RNA) erfolgte durch die UV-spektroskopische Messung mittels des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers.

3.6.2 Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten nach ihrer Größe sowie der Beurteilung der Integrität und Reinheit der Nukleinsäurelösung. Je nach gewünschter Auflösung wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1–3% (w/v) in TAE-Puffer angesetzt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und bei 8–10 V/cm Gellänge in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Als Größenmarker wurden die DNA-Standards Ultra Low Range DNA-Leiter II bzw. 1kb DNA-Leiter mitgeführt. Anschließend wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt. Zur Überprüfung der RT-PCR-Produkte der *in vitro*-Selektion wurde die noch flüssige Agarose vor dem Gießen direkt mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt, um eine gleichmäßige Bandenintensität zu gewährleisten.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ermöglicht eine feinere Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten und wurde insbesondere für die Separation von RNA-Molekülen angewendet. Abhängig von der Fragmentgröße wurden Gele mit einer Konzentration von 6 bis 15% (v/v) Acrylamid hergestellt. Zur Polymerisation wurden 0,01 Vol. 10% APS und 0,001 Vol. TEMED zugesetzt. Denaturierende Gele enthielten zusätzlich 8 M Harnstoff mit 1x TBE als Puffer. Als Größenmarker diente der Low Range ssRNA Ladder. Die Proben sowie der Größenmarker wurden vor dem Gellauf 5 min auf 95°C in 2x RNA-Ladepuffer erhitzt und danach direkt auf Eis abgekühlt. Die verwendeten Spannungen lagen zwischen 15–30 V/cm Gellänge. Zur Visualisierung wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt. Radioaktiv markierte RNA wurde mittels Phosphorimaging sichtbar gemacht.

3.6.3 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung von Nukleinsäuren und Entfernung von Salzen wurden folgende Präzipitationen durchgeführt:

Ethanol/Isopropanol-Präzipitation mit Natriumacetat

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 0,1 Vol. Natriumacetat pH 6,5 und 2,5 Vol. Ethanol oder Isopropanol versetzt und anschließend 30 min bei -20°C inkubiert. Es folgte eine gekühlte Zentrifugation (4°C, 17.000x g, 30 min). Der Nukleinsäureniederschlag wurde zweimal mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und je 10 min zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde der Niederschlag luftgetrocknet und in MQ-H₂O gelöst.

Dem Ansatz wurde 1 µl GlycoBlue hinzugefügt, um die Präzipitation von eluierter RNA während des SELEX-Prozesses zu erleichtern und den RNA-Niederschlag besser visualisieren zu können.

Butanol-Präzipitation

Die Butanol-Präzipitation wurde zum Entsalzen kleiner Volumina verwendet. Hierfür wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 10 Vol. n-Butanol versetzt, intensiv gemischt und zentrifugiert (RT, 17.000x g, 10 min). Der Nukleinsäureniederschlag wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde der Niederschlag luftgetrocknet und in MQ-H₂O gelöst.

Ammoniumacetat-Präzipitation

Zur Vermeidung von Kopräzipitationen radioaktiver Nukleosidtriphosphate wurde transkribierte, markierte RNA mithilfe von Ammoniumacetat gefällt. Die RNA-Lösung wurde mit 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol. Ethanol versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (17.000x g, 15 min). Der RNA-Niederschlag wurde zweimal mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und für je 10 min zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde die RNA luftgetrocknet und in MQ-H₂O gelöst.

3.6.4 Phenolisierung von Nukleinsäuren

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und geschüttelt. Das Gemisch wurde in ein vorbereitetes MaxTract-Gefäß überführt und nach Herstellerangaben zentrifugiert (je nach verwendetem MaxTract High Density-Kit). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues MaxTract-Gefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach Schütteln und Zentrifugation wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer ethanolischen Fällung mit Natriumacetat unterzogen.

3.6.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Gelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Aufreinigung von RNA-Molekülen aus denaturierenden Polyacrylamidgelen wurden diese ausgeschnitten, in kleine Stücke zerteilt und über Nacht in 0,3 M Natriumacetat bei 4°C eluiert.

3.6.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierungen von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit oder dem QIAfilter Plasmid Maxi/Giga Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.6.7 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen im jeweiligen, vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer fragmentiert. Die einzusetzende Enzymmenge (Units) sowie die Dauer der Restriktion wurde an die Menge der DNA und den Eigenschaften der Nuklease angepasst. Die Definition der Units sowie die Referenz-DNA werden hierbei vom Hersteller der Restriktionsendonukleasen angegeben:

$$\text{benötigte Units} = \frac{\text{Länge (Referenz-DNA)} * \text{Schnittstellenhäufigkeit (Probe)}}{\text{Länge (Probe)} * \text{Schnittstellenhäufigkeit (Referenz-DNA)}}$$

3.6.8 Ligationen von DNA-Fragmenten

Ligationen von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA-Ligase entweder bei Raumtemperatur für 1 h oder bei 16°C für 16 h durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug 5 zu 1:

$$m_{\text{Insert}}[\text{ng}] = \frac{5 * m_{\text{Vektor}}[\text{ng}] * \text{Länge}_{\text{Insert}}[\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]}$$

3.6.9 5'-Dephosphorylierung und 5'-Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Eine Entfernung von Phosphatgruppen an 5'-DNA-Strängen wurde durchgeführt, um eine Religation des linearisierten Vektors ohne Integration des Inserts zu verhindern. Eine 5'-Dephosphorylierung von RNA-Molekülen diente der nachfolgenden radioaktiven Endmarkierung. Die Dephosphorylierung wurde mit der Antarktischen Phosphatase nach Herstellerangaben durchgeführt. Die einzusetzende Enzymmenge richtete sich dabei nach der Menge an freien DNA-/RNA-Enden. Die Reaktionen wurden bei 37°C inkubiert und anschließend 5 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

5'-Phosphorylierungen erfolgten mithilfe der T4 Polynukleotidkinase (PNK). Hybridisierte Oligonukleotide (1 nmol) wurden hierzu mit 10 mM ATP und 10 U PNK in Reaktionspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionen 5 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Zur radioaktiven Endmarkierung wurden dephosphorylierte und ethanolisch gefällte RNA-Moleküle unter Verwendung von 1 µl [γ - 32 P] ATP und der PNK phosphoryliert.

3.6.10 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA

Zur Generierung kurzer doppelsträngiger DNA-Moleküle (< 100 bp) wurden komplementäre Oligonukleotide (10 µM in MQ-H₂O) im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 min auf 95°C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Hybride wurden anschließend 5'-phosphoryliert. Zu Klonierungszwecken enthielten die hybridisierten DNA-Fragmente passgenaue Nukleotidüberhänge zu den Restriktionsschnittstellen des Zielvektors.

3.6.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) dient zur gezielten *in vitro*-Amplifizierung von DNA. Sie wurde zu analytischen Zwecken (Kolonie-PCRs, RT-PCR-Analysen) und für Klonierungsvorhaben (Einbringung von Restriktionsschnittstellen, Mutagenesen) eingesetzt. Für analytische PCRs wurde Taq-Polymerase verwendet; DNA-Amplifikationen für Klonierungszwecke wurden mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion durchgeführt (Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase).

Mithilfe von Kolonie-PCRs wurden erfolgreiche Transformationen von Fremd-DNA in Bakterien überprüft. *E. coli*-Kolonien wurden jeweils in 5 µl MQ-H₂O suspendiert und 5 min bei 95°C aufgeschlossen. Luftmyzel von *S. coelicolor* wurde in 20 µl DMSO aufgenommen und 10 min bei 95°C aufgeschlossen. Aufgrund der Gram-positiven Zellwand und des hohen GC-Gehalts erwies sich die Verwendung der Phusion Polymerase effektiver für die analytischen PCRs mit *Streptomyces*-Myzel.

Tabelle 11: Kolonie-PCR-Ansatz *E. coli*.

10x Thermopol-Puffer	2 µl
Oligonukleotid Forward (100 pmol/µl)	1 µl
Oligonukleotid Reverse (100 pmol/µl)	1 µl
dNTPs (25 mM je dNTP)	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,3 µl
Matrize	5 µl aufgeschlossene Kolonie in MQ-H ₂ O
MQ-H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 12: Kolonie-PCR-Ansatz *S. coelicolor*.

5x GC-Puffer	10 µl
Oligonukleotid Forward (10 pmol/µl)	1,5 µl
Oligonukleotid Reverse (10 pmol/µl)	1,5 µl
dNTPs (25 mM je dNTP)	1 µl
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,3 µl
Matrize	5 µl aufgeschlossenes Myzel in DMSO
MQ-H ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 13: PCR-Ansatz zu Klonierungszwecken.

5x GC-Puffer	20 µl
Oligonukleotid Forward (10 pmol/µl)	2 µl
Oligonukleotid Reverse (10 pmol/µl)	3 µl
dNTPs (25 mM je dNTP)	2 µl
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,5 µl
Matrize	0,1–10 ng DNA in MQ-H ₂ O
MQ-H ₂ O	ad 100 µl

Die Matrizen wurden initial denaturiert (30 s bis 5 min; Taq: 95°C; Phusion: 98°C) und anschließend durch 25–35 Zyklen amplifiziert: Denaturierung (10–30 s bei 95°C/ 98°C), Hybridisierung (20–30 s bei 50–60°C) und Elongation (Taq: 60 s/kb; Phusion: 30 s/kb; 72°C). Eine finale Elongation (5 min bei 72°C) erfolgte je nach PCR optional.

3.6.12 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde verwendet, um den mittels SELEX angereicherten RNA-Pool durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben und anschließend über eine PCR zu amplifizieren. Dazu wurden 50 µl eluierte RNA einer SELEX-Runde zu 48 µl 2x RT-PCR-Reaktionsansatz gegeben, 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend direkt auf Eis abgekühlt.

Die RT-PCR-Reaktion wurde nach Zugabe von je 1 µl Taq-Polymerase und SuperScript II Reverse Transkriptase im Thermocycler gestartet. Die Reverse Transkription erfolgte 10 min bei 54°C. Die cDNA wurde anschließend durch 4–18 Zyklen amplifiziert: Denaturierung (45 s bei 95°C), Hybridisierung (45 s bei 58°C) und Elongation (45 s; 72°C).

3.6.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde mittels des Kettenabbruchverfahrens von der SeqLab Sequence Laboratories GmbH (Göttingen) oder dem „Sequencing Service“ (LMU Biozentrum, Martinsried) durchgeführt.

3.6.14 *In vitro*-Transkription

Während des SELEX-Prozesses wurden 10 µl RT-PCR-Produkt zu 87 µl TK-Mix (siehe Tab. 8) gegeben und mit 3 µl T7-RNasin-Mix (2:1) versetzt. Für die radioaktive Markierung wurde 1 µl [α -³²P] UTP in den Transkriptionsansatz gegeben. Die (radioaktive) Transkription erfolgt bei 37°C für 2 h.

Die Produktion von RNA in Milligrammmengen erfolgte durch eine *run off*-Transkription von den linearisierten Plasmiden pSP64 (Promega) bzw. pWHE200 (Ameres, *et al.*, 2005). Die im großen Maßstab isolierten Plasmide (Maxiprep/Gigaprep) wurden mit EcoRI bzw. HindIII linearisiert und mittels Phenolisierung aufgereinigt. Die lineare DNA (1–2 mg) wurde mit 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM Magnesiumacetat, 50 mM DTT, 2 mM Spermidin, je 4 mM NTP und 15 µl T7 RNA-Polymerase versetzt. Die Transkription wurde 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem denaturierendem PAA-Gel aufgetrennt. Die Produktbande wurde ausgeschnitten und über Nacht in 300 mM Natriumacetat pH 6,5 eluiert und anschließend ethanolisch gefällt.

3.7 Stammhaltung und Gentechnische Modifizierung von Mikroorganismen

3.7.1 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

3.7.1.1 *E. coli*

Für molekularbiologische Zwecke (DNA-Isolierungen, Transformationen, Herstellung kompetenter Zellen) erfolgte die Kultivierung von *E. coli* in LB-Medium (konstante Schüttelkultur: 120–150 rpm) bei 37°C. Das Kulturmedium wurde je nach Bakterienstamm/transformiertem Plasmid mit der entsprechenden Menge des zur Selektion erforderlichen Antibiotikums versetzt. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt. Die kurzzeitige Lagerung erfolgte auf LB-Agarplatten bei 4°C. Zur Stammhaltung

wurden Glycerin-Kryokulturen angelegt. Hierfür wurde 1 ml Bakterien-Flüssigkultur mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.7.1.2 *S. coelicolor*

Zur Langzeitlagerung wurden von allen *S. coelicolor*-Stämmen Gefrierkulturen der Sporen in Glycerin-Konservierungsmedium angelegt (Lagertemperatur -80°C). Hierfür wurden die Sporen von *Streptomyces*-Kulturen von SM- oder R2YE-Agarplatten mit einem Zellschaber entnommen, in eine 20%ige Glycerinlösung gegeben und mithilfe einer mit Watte gefüllte Spritze vom mitgeführten Luftmyzel separiert. Der Sporentiter wurde nach Quantifizierung mit einer Zählkammer auf 10^9 /ml eingestellt.

Als Inokulum für Flüssig- und Agarkulturen wurden vorgekeimte Sporen verwendet. Hierzu wurden die Sporen-Kryokulturen langsam auf Eis aufgetaut und anschließend 10 min einem Hitzeschock bei 50°C in 3% TSB-Medium ausgesetzt. Für Flüssigkulturen wurden 50 ml 3% TSB-Medium (supplementiert mit 50 µg/ml Apramycin) standardmäßig mit 10^8 vorgekeimten Sporen beimpft. Die Schüttelkulturen (150 rpm) wurden in 250 ml Schikanekolben bei 28°C für bis zu 90 h inkubiert.

Aufgrund des myzelartigen Wachstums wurde zur Quantifizierung des Kulturwachstums eine Trockengewichtsbestimmung der OD₆₀₀-Messung vorgezogen. Hierzu wurden Flüssigkulturen zu bestimmten Zeitpunkten durch ein zuvor gewogenes und getrocknetes Filterpapier (SUPOR 450; 0,45 µm; Pall Corporation) mittels Vakuum filtriert. Das Filterpapier wurde mit MQ-H₂O gewaschen und getrocknet (2h, 80°C). Nach erneutem Wiegen wurde die Differenz zum leeren Filterpapier und somit das Trockengewicht des *Streptomyces*-Myzels bestimmt.

Als Festnährböden wurden SM-, R2YE oder MM-Agarplatten (supplementiert mit 50 µg/ml Apramycin) verwendet; diese wurden bei 28°C für bis zu 90 h inkubiert. *Streptomyces*-Sporen wurden mit sterilen Spateln ausgestrichen, Luftmyzel wurde mit einer sterilen Impföse auf frische Agarplatten vereinzelt.

3.7.1.3 *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde bei 28°C in Flüssigmedium (konstante Schüttelkultur: 120–150 rpm) oder auf Agarplatten jeweils auf SCD-URA-Medium kultiviert. Zur Stammhaltung wurden Glycerin-Kryokulturen angelegt. Hierfür wurde 1 ml Hefe-Flüssigkultur mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.7.2 DNA-Transfer in Bakterien und Hefen

3.7.2.1 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden chemische Transformationen von CaCl_2 -kompetente Zellen und Elektroporationen genutzt. Die Herstellung der chemisch-/elektrokompetenten Zellen und die Transformationen erfolgten nach den Protokollen von Sambrook bzw. Dower (Dower, *et al.*, 1988, Sambrook & Russel, 2001).

3.7.2.2 Intergenerische Konjugation von *E. coli* ET12567/pUZ8002 zu *S. coelicolor*

E. coli kann DNA in entfernt verwandte Bakterienstämme mittels eines Mobilisierungssystems übertragen (Mazodier & Davies, 1991). Stämme, die das Fertilitätsplasmid pUZ8002 tragen, können als Donoren für Plasmide mit einem RP4 *origin of transfer* (*oriT*) fungieren. Zur intergenerischen Konjugation in *S. coelicolor* müssen die Plasmide in einem methylierungsdefizienten *E. coli*-Stamm propagiert werden, weil der Actinomycet als Abwehrsystem Restriktionsendonukleasen produziert, welche heterologe, methylierte DNA abbauen (Cox & Baltz, 1984).

Hierzu wurden die zu konjugierenden Plasmide in den Stamm *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert. Die Zellen einer halben LB-Agarplatte wurden mit einem Zellschaber entnommen und direkt mit 500 μl vorgekeimten *S. coelicolor*-Sporen gemischt. Das Bakteriengemisch wurde auf SM-Agarplatten (+10 mM MgCl_2) ausgestrichen und 8 h bei 28°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit je 2,5 ml Soft Nutrient Agar (+ 30 μl 50 mg/ml Apramycin; + 30 μl 25 mg/ml Nalidixinsäure oder Fosfomycin) überschichtet und bei 28°C für mehrere Tage inkubiert. Die Exkonjuganden wurden auf SM-Agarplatten (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Apramycin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nalidixinsäure oder Fosfomycin und 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid) vereinzelt und der Kolonie-PCR unterzogen.

3.7.2.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation wurde mit dem Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit™ nach den Herstellerangaben von Zymo Research durchgeführt. 10 μl kompetente *S. cerevisiae* RS453-Zellen wurden mit 3–5 μl Plasmidlösung (100–400 ng; \pm Insert zur homologen Rekombination) und 100 μl EZ3-Lösung versetzt, geschüttelt, 45 min bei 30°C inkubiert und anschließend vollständig auf SCD-URA-Agarplatten ausgestrichen.

3.8 Reporter-gen-Assays

3.8.1 Gus-Messung bei *S. coelicolor*

50 ml 3% TSB-Medium (supplementiert mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Apramycin und variierenden Konzentrationen von Theophyllin) wurden mit 10^8 vorgekeimten Sporen beimpft. Nach 90 h Schüttelkultur bei 28°C wurde das Myzel durch Zentrifugation (6000x g, 15 min) geerntet, mit

MQ-H₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Zum Zellaufschluss wurde das Myzel mit 200 µl Glasperlen (0.25–0.5 mm) und 500 µl Gus-Puffer in einer FastPrep®-24 homogenisiert. Die nicht löslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt (4°C, 17.000x g, 30 min). Der Proteingehalt des Überstands wurde mithilfe des Bradford-Assays bestimmt (Bradford, 1976). 1–25 µg Gesamtprotein wurden in 1 Vol. 750 µl Gus-Puffer 15 min bei 28°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 80 µl 0,2 M p-Nitrophenyl-β-D-Glucuronidlösung in Gus-Puffer gestartet. Bei Eintreten einer gelblichen Färbung wurde die Reaktion mit 300 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 415 nm gemessen und durch die eingesetzten Proteinmenge und die Reaktionszeit in Minuten dividiert um die spezifische GusA-Aktivität [$A_{415} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$] zu berechnen. Diese repräsentiert die dargestellten „Gus Units“ [GU]. Jede Messung wurde stets mit drei biologischen Replikaten pro Stamm durchgeführt und repliziert.

Zur Detektion der GusA-Expression auf Festnährböden wurden die Exkonjuganden auf SM-Agarplatten ausgestrichen (supplementiert mit 50 µg/ml Apramycin und ± 2 mM Theophyllin). Nach Kultivierung von 90 h bei 28°C wurden die Platten mit 2 ml des chromogenen Substrates X-Gluc (50 µg/ml in DMF) überschichtet. Nach einer Inkubation von ca. 2 h bei 28°C wird die GusA-Expression durch das Erscheinen eines dunkelblauen Farbstoffes (5,5'-Dibrom-4,4'-Dichloro-Indigo) angezeigt.

3.8.2 GFP-Messung bei *S. cerevisiae*

Die transformierten Hefen wurden mittels eines fraktionierten Ausstrichs vereinzelt. Ein Reagenzglas mit 4 ml SCD-URA-Medium wurde mit einer Hefekolonie beimpft und für 24 h bei 30°C schüttelnd kultiviert. Mit 20 µl dieser Vorkultur wurde je ein Well einer Mikrotiterplatte (96-Well, U-Bottom) beimpft (Gesamtvolumen 200 µl) und statisch für 48 h bei 28°C inkubiert. Die GFP-Fluoreszenz wurde mithilfe des Mikroplatten-Readers (Tecan) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm vom Boden der sedimentierten Hefen gemessen. Anschließend wurden die Hefen aufgeschüttelt und die optische Dichte wurde als Referenz bei 600 nm gemessen.

3.9 Software

Tabelle 14: Liste der verwendeten Software.

Software	Verwendung
CorelDrawX4 (Corel Corporation)	Bildbearbeitung
FluorEssence™ (Horiba)	Auswertung von Fluoreszenzspektren
i-control (Tecan Group Ltd.)	Auslesen von Mikrotiterplatten
Origin 7.0 ITC Software	ITC-Auswertung
PrimerSelect 7.1.0 (DNASTAR)	Planung von Oligonukleotiden und PCRs
Seq Builder 7.1.0 (DNASTAR)	Plasmidanalyse
SeqMan 7.1.0 (DNASTAR)	Sequenzierungsanalyse
SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc.)	Datenanalyse
Vector NTI 11.0 (Life Technologies)	Plasmidanalyse

4 Ergebnisse

Der Ergebnissteil gliedert sich in zwei Abschnitte. Im ersten Abschnitt erfolgt die Beschreibung der *in vitro*-Selektionen von RNA-Aptameren gegen Azobenzolderivate unter Verwendung paramagnetischer Partikel und mittels säulenbasierter Affinitätschromatographie.

Die Konstruktion konditionaler Expressionssystemen in *S. coelicolor* mittels synthetischer Riboswitche wird in Kapitel 4.6 beschrieben.

4.1 Grundlagen zur *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren

4.1.1 RNA-Bibliotheken

Den Ausgangspunkt aller *in vitro*-Selektionen stellten zwei (teil-)randomisierte RNA-Bibliotheken dar. In Anlehnung an Davis und Szostak wurde ein 1:1-Gemisch einer vollständig randomisierten Bibliothek und einer vorstrukturierten Bibliothek gewählt (Davis & Szostak, 2002). Wie in Abbildung 11 gezeigt wird, besitzt die randomisierte Bibliothek einen Kernbereich von 64 Nukleotiden. Die vorstrukturierte Bibliothek besitzt im Kernbereich einen 4 bp-Stamm und einem stabilen UUCG-Tetraloop, welcher von je 26 Nukleotiden umgeben ist. Beide Bibliotheken werden von zwei endständigen, konstanten Bereichen flankiert, welche für die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation notwendig sind (Oligonukleotide POOL-FWD/-REV, siehe Tab. 9). Die 5'- und 3'-konstanten Bereiche der RNA-Bibliotheken waren so gewählt, dass diese miteinander Watson-Crick-Basenpaarungen eingehen konnten und somit den (teil-)randomisierten Kernbereich für die Interaktion mit dem Liganden freigaben.

Die DNA-Bibliotheken wurden freundlicherweise von Florian Groher bereitgestellt. Die Transkription in großem Maßstab erfolgte wie in 3.6.14 beschrieben, wodurch 3 mg der vollständig randomisierten und 2 mg der teilrandomisierten RNA-Bibliothek erhalten wurden.

(a)

DNA-Bibliothek:

5' - GTATAATACGACTCACTATAGGGGAGACGCAACTGAATGAA - N₆₄ - TCCGTAAGTTCGCGTCAC - 3'
 3' - CATATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGCGTTGACTTACTT - N₆₄ - AGGCATTGATCAGCGCAGTG - 5'

↓
Transkription

RNA-Bibliothek:

5' - GGGAGACGCAACUGAAUGAA - N₆₄ - UCCGUAACUAGUCGCGUCAC - 3'

(b)

DNA-Bibliothek:

5' - GTATAATACGACTCACTATAGGGGAGACGCAACTGAATGAA - N₂₆ - CUGCUCGGCAG - N₂₆ - TCCGTAAGTTCGCGTCAC - 3'
 3' - CATATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGCGTTGACTTACTT - N₂₆ - GACGAAGCCGTC - N₂₆ - AGGCATTGATCAGCGCAGTG - 5'

↓
Transkription

RNA-Bibliothek:

U C
 U G
 C - G
 G - C
 U - A
 C - G

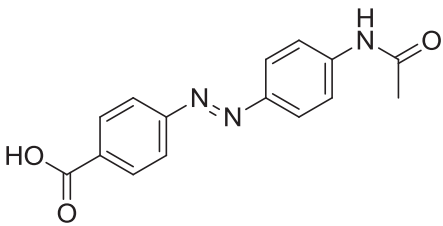
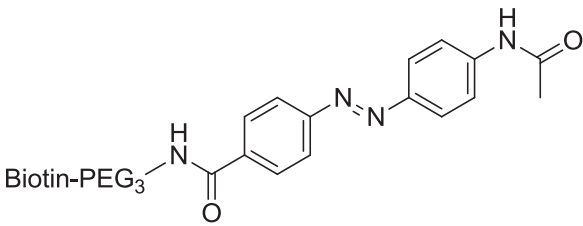
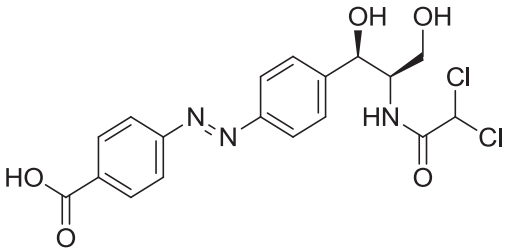
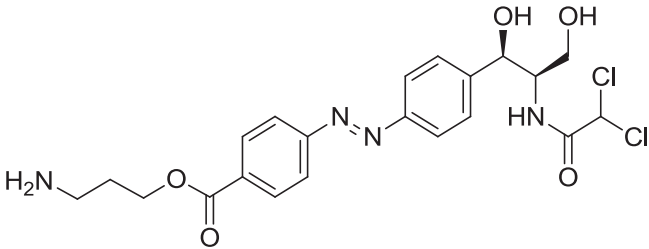
5' - GGGAGACGCAACUGAAUGAA - N₂₆ - C - G - N₂₆ - UCCGUAACUAGUCGCGUCAC - 3'

Abbildung 11: Schematische Darstellung der zur *in vitro*-Selektion verwendeten RNA-Bibliotheken. (a) DNA-Matrize und transkribierte RNA der vollständig randomisierten Bibliothek. (b) DNA-Matrize und transkribierte RNA der vorstrukturierten Bibliothek. Beide Bibliotheken besitzen eine Gesamtgröße von 124 bp (DNA-Matrize) bzw. 104 nt (RNA). Die Oligonucleotide, welche die konstanten 5'- und 3'-Bereiche bereitstellen, sind fett hinterlegt. Die T7-Promotorsequenz ist unterstrichen. Die möglichen Basenpaarungen zwischen den 5'- und 3'-konstanten Bereichen der RNA-Stränge sind durch unterbrochene, miteinander verbundene Linien gekennzeichnet.

4.1.2 Verwendete Azobenzolderivate

Die Synthese der Azobenzolderivate erfolgte durch Thomas Halbritter im Arbeitskreis von Prof. Dr. Alexander Heckel an der Goethe-Universität Frankfurt a.M. In Tabelle 15 werden alle Azobenzolderivate aufgelistet, die zur Durchführung der *in vitro*-Selektionen verwendet wurden. Es wurden Stammlösungen in DMSO hergestellt. Diese wurden bei 4°C gelagert. Weitere Verdünnungen erfolgten durch MQ-H₂O bzw. durch den entsprechenden SELEX-Puffer.

Tabelle 15: Verwendete Azobenzole.

Name	Chemische Struktur*
TH72	 <p>MW: 283,28 g/mol; Stammlösung: 50 mM in DMSO</p>
TH72-Biotin	 <p>MW: 581,93 g/mol; Stammlösung: 50 mM in DMSO</p>
TH-CA	 <p>MW: 426,25 g/mol; Stammlösung: 100 mM in DMSO</p>
TH-CA-Amino	 <p>MW: 483,35 g/mol; Stammlösung: 50 mM in DMSO</p>

* dargestellt in der *trans*-Form.

4.2 *In vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen Azobenzole unter Verwendung paramagnetischer Partikel

Zur *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen das Azobenzolderivat TH72 (siehe Tab. 15) kamen streptavidinbeschichtete paramagnetische Partikel der Marke „Dynabeads® M280 Streptavidin“ zum Einsatz. Diese werden der Einfachheit halber im Folgenden als „Beads“ bezeichnet.

4.2.1 Immobilisierung von TH72-Biotin an Beads

Das Zielmolekül TH72 wurde durch T. Halbritter mit einem PEGylierten Biotinlinker versehen (TH72-Biotin, siehe Tab. 15). Dieser ermöglicht die direkte Kopplung des Azobenzols an die Beads über die hochspezifische Streptavidin-Biotin-Interaktion (Green, 1975).

Die Beads besitzen laut Herstellerangaben eine Beladungskapazität von 650–900 pmol/mg. Zur Immobilisierung wurden 5 mg der magnetisch separierten Beads eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl 1x PBS wurden die Beads mit 100 nmol TH72-Biotin für 30 min bei RT inkubiert. Dabei wurden sie im fünfminütigen Abstand durchmischt, um eine Sedimentation zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen in PBS-Lagerungspuffer (siehe Tab. 8) wurden die Beads zu 3,33 mg/ml in selbigem Puffer aufgenommen. Die zur Negativselektion genutzten Beads wurden ohne Kopplungspartner inkubiert und ebenfalls zu 3,33 mg/ml resuspendiert. Die Lagerung aller Beads erfolgte bei 4°C.

Zur internen Kontrolle der Kopplungseffizienz wurden die derivatisierten Beads mit einem Biotin-Fluoresceinkonjugat (FITC-Biotin) inkubiert. Je größer die Anzahl der freien Streptavidin-bindetaschen war, desto mehr FITC-Biotin band an die Beads. Es wurde davon ausgegangen, dass die gebundene FITC-Biotinmenge und somit auch die Fluoreszenzintensität antiproportional zur Kopplungseffizienz waren. Als Referenzen dienten nicht derivatisierte und mit Biotin gekoppelte Beads. In Abbildung 12 ist zu sehen, dass die mit den Liganden inkubierten Beads eine geringere Fluoreszenzintensität zeigten als die nicht derivatisierten Beads. Die Immobilisierung war somit erfolgreich. Dieser FITC-Biotintest wurde nach jeder Herstellung neuer derivatisierter Beads durchgeführt. Dabei wurden leichte Schwankungen bezüglich der Kopplungseffizienz beobachtet.

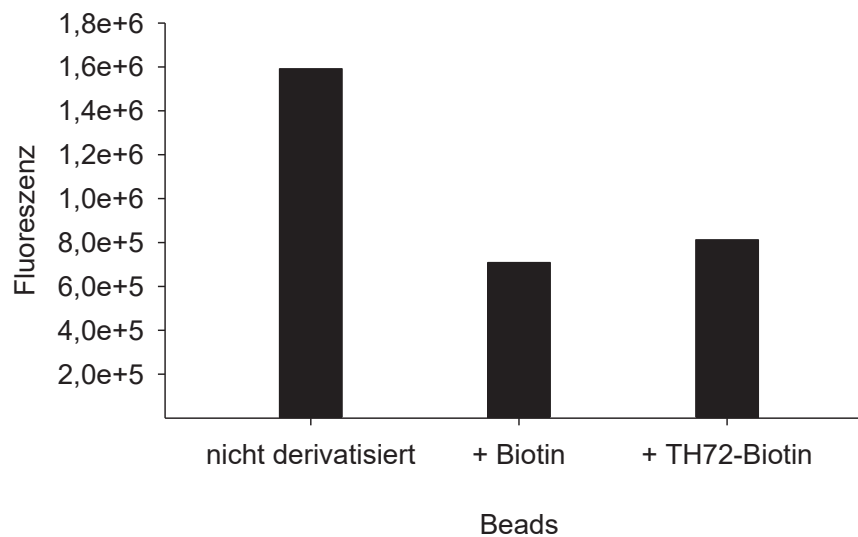


Abbildung 12: Nachweis der Immobilisierung von TH72-Biotin an „Dynabeads® M280 Streptavidin“. Die mit TH72-Biotin und Biotin derivatisierten Beads wurden ebenso wie die nicht derivatisierten Beads mit FITC-Biotin inkubiert. Anschließend erfolgten Fluoreszenzmessungen bei 520 nm im Fluorolog-3 Spektrofluorometer (Anregungswellenlänge: 490 nm). Die ermittelte Fluoreszenz wurde auf die jeweilige OD₆₀₀ der Beads-Suspension normiert. Der Nachweis wurde in Einzelmessungen durchgeführt.

4.3 Durchführung der SELEX

4.3.1.1 Initiale SELEX-Runde

Der SELEX-Prozess wird in Abbildung 13 veranschaulicht. In der initialen Runde wurden je 0,5 nmol (entspricht $\sim 3 \cdot 10^{14}$ Sequenzen) der RNA-Bibliotheken (vollständig randomisiert und vorstrukturiert) gemeinsam in einem Gesamtvolumen von 100 µl in 1x PBS, 3 mM MgCl₂ und 1 mg/ml BSA gelöst. Das Gemisch wurde auf 80 µl magnetisch separierte, nicht derivatisierte Beads gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Diese Negativselektion sollte zur Entfernung aller RNA-Spezies dienen, die Teile des Dynabeads®-Komplexes banden. Die Beads wurden während der Inkubation in fünfminütigen Abständen durchmischt. Der Überstand der Negativselektion wurde auf 80 µl separierte, mit TH72-Biotin derivatisierte Beads gegeben und wie oben beschrieben inkubiert. Die Beads wurden anschließend sorgfältig mit 100 µl PBS-Waschpuffer gewaschen, ohne diese dabei zu resuspendieren. Nach magnetischer Separation wurde der Überstand verworfen und die Beads-RNA-Komplexe in 50 µl MQ-H₂O resuspendiert. Durch eine Inkubation von 5 min bei 80°C wurde die RNA eluiert. Der gesamte Überstand wurde zu 48 µl 2x-RT-PCR-Mix (siehe Tab. 8) gegeben und nach Zugabe von 1 µl Taq-Polymerase und 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase der RT-PCR unterzogen. Das RT-PCR-Produkt wurde auf einem 3%-igem Agarosegel überprüft. Die Anzahl der RT-PCR-Zyklen

wurden so angepasst, dass das Amplifikationsprodukt auf dem Agarosegel eine vergleichbare Intensität wie die 0,1 kb-Bande der eingesetzten Ultra Low Range DNA-Leiter II (siehe Tab. 5) aufwies.

10 µl der RT-PCR-Reaktion wurden mit 87 µl TK-Mix und 3 µl T7-RNasin-Mix (siehe Tab. 8) versetzt und durch eine 15-minütige *in vitro*-Transkription bei 37°C zu RNA umgeschrieben.

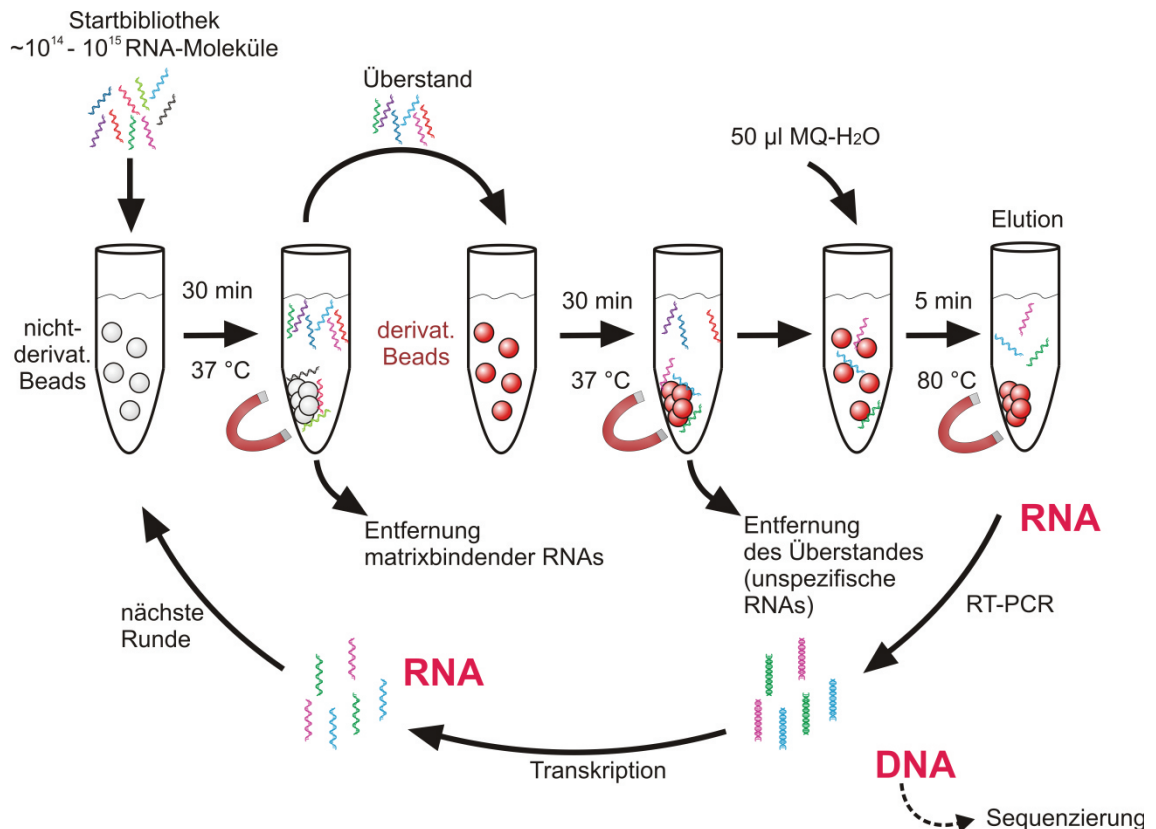


Abbildung 13: Schematische Darstellung der *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren unter Verwendung paramagnetischer Partikel. Die einzelnen Schritte werden im Text beschrieben.

4.3.1.2 Weitere SELEX-Runden

Die folgenden SELEX-Runden wurden analog zur initialen Runde durchgeführt, wobei stets ein Negativselektionsschritt vorgeschaltet wurde. Dazu wurden 20 µl des Transkriptionsansatzes aus der vorhergehenden Runde mit 80 µl nicht derivatisierten Beads in PBS-Lagerungspuffer gemischt und wie oben beschrieben inkubiert. In den angeschlossenen Hauptselektionen erfolgte eine schrittweise Anhebung der Anzahl der Waschschrte, welche auf den jeweiligen Selektionsverlauf abgestimmt wurde.

In Abbildung 14 ist der Verlauf der SELEX dargestellt. Die zur Amplifikation benötigten RT-PCR-Zyklen wurden als erstes Indiz für die Anreicherung des RNA-Pools betrachtet. In den ersten drei Runden stieg die Anzahl dieser benötigten Zyklen an, sank dann jedoch kontinuierlich von

15 Zyklen (Runde 3) auf 5 Zyklen (Runde 9). Gleichzeitig erhöhte sich die Anzahl der Waschschrte (und somit die Stringenz) von 2 (Runde 3) auf 6 Schritte (Runde 9). Nach Runde 9 wurde die SELEX beendet und der Pool näher charakterisiert.

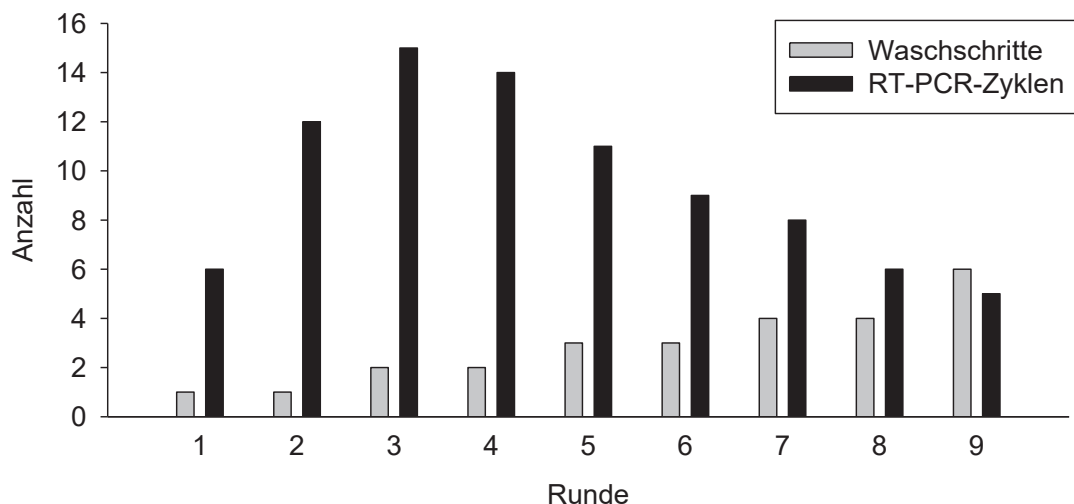


Abbildung 14: Verlauf der *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen TH72-Biotin unter Verwendung der Dynabeads® M280 Streptavidin. Gezeigt ist die in den einzelnen Runden der Selektion ausgeübte Anzahl an Waschschrten (graue Balken), durch welche die Stringenz reguliert wurde. Außerdem werden die zur Produktformation benötigten RT-PCR-Zyklen dargestellt (schwarze Balken).

4.3.2 Bindungsstudien des angereicherten Pools an Beads

Zur Überprüfung der Anreicherung bindender RNA-Spezies wurden die RT-PCR-Produkte aus den Runden 1 und 9 radioaktiv transkribiert und Bindungsstudien unterzogen. Die einzelnen Bindungstests sind in Abbildung 15 gezeigt. Die Überprüfung der Pools erfolgte über konventionelle Bindungstests analog zur Durchführung der SELEX sowie über Tests zur Matrixbindung unter Verwendung nicht derivatisierter Dynabeads® M280 Streptavidin. Es wurden hierzu 20.000 counts radioaktiv markierter Pools mit 80 µl (nicht) derivatisierten Beads in PBS-Lagerungspuffer (supplementiert mit 3 mM MgCl₂) gemischt. Gemäß den SELEX-Bedingungen wurde der Ansatz 30 min bei 37°C unter ständigem Durchmischen inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 100 µl PBS-Waschpuffer gewaschen. Die Beads wurden in 100 µl MQ-H₂O resuspendiert. Die Elution erfolgte bei 80°C für 5 min. Alle Fraktionen – der Überstand nach Inkubation bei 37°C, beide Waschfraktionen, das Eluat und die Beads (resuspendiert in 100 µl MQ-H₂O) – wurden gesammelt; je 50 µl wurden mit 2 ml Szintillationscocktail versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen. Der Anteil bindender RNA ergab sich aus dem Verhältnis der in den Fraktionen Eluat und Beads gemessenen Radioaktivität zur insgesamt detektierten Menge. Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in Abbildung 16 gezeigt. Es fand keine Bindung des naiven und des angereicherten Pools an nicht

derivatisierte Beads statt. Der naive Pool band ebenso wenig an mit TH72-Biotin derivatisierte Beads. Nur der neun SELEX-Runden unterzogene Pool wies eine Bindung an die derivatisierten Beads auf (12,5%). Es konnte somit von einer Anreicherung azobenzol-spezifischer RNA-Moleküle ausgegangen werden.

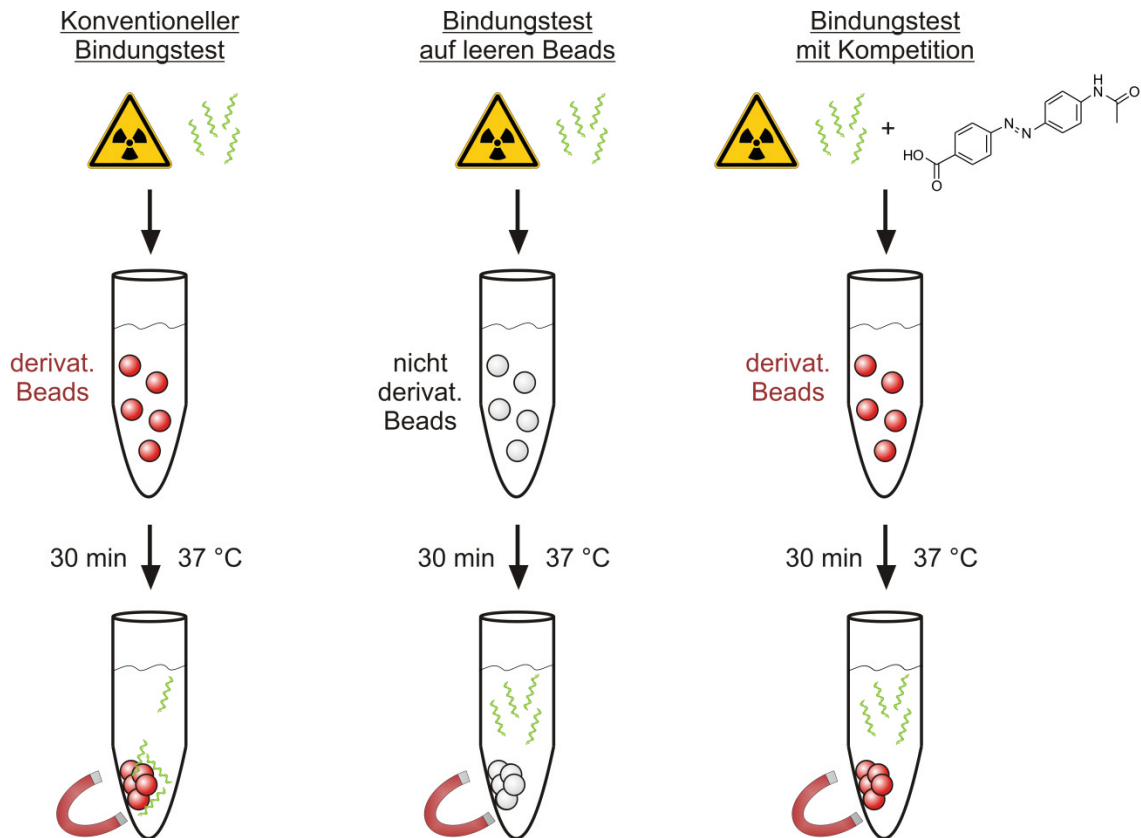


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Validierungsexperimente zur Bestimmung der Bindungsspezifität des angereicherten Pools und der einzelnen Aptamerkandidaten. Der konventionelle Bindungstest (links) entspricht dem Durchlauf einer SELEX-Runde. Beim Test auf Matrixbindung (Mitte) wurde die RNA-Lösung auf nicht derivatisierte Dynabeads® M280 Streptavidin gegeben. Bei den Konkurrenztests (rechts) wurde die RNA vor der Zugabe zu den Beads mit dem freien Azobenzol TH72 inkubiert. Die Ausbildung eines RNA-Ligandenkomplexes sollte dabei die Bindung der RNA an die derivatisierten Beads unterbinden.

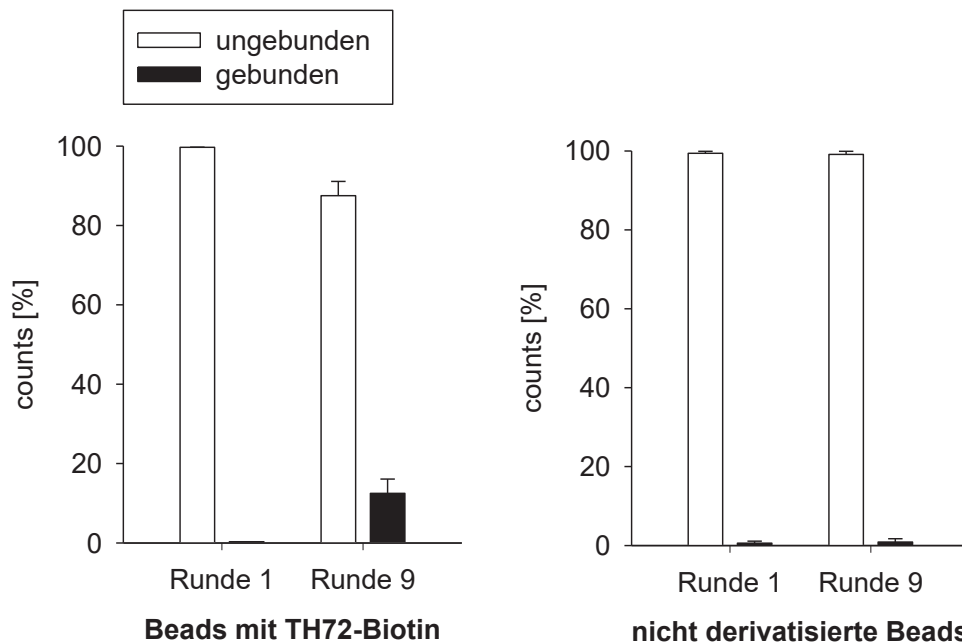


Abbildung 16: Bindungsstudien der Runden 1 und 9 der *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen TH72-Biotin unter Verwendung der Dynabeads® M280 Streptavidin. Es erfolgten konventionelle Bindungsstudien an Beads, welche mit TH72-Biotin derivatisiert waren (links) und Matrixbindungsstudien an nicht derivatisierten Beads (rechts). Der Anteil ungebundener RNA setzt sich aus der ermittelten Radioaktivität der Fraktionen Überstand, Waschfraktion 1 und Waschfraktion 2 zusammen. Die ermittelte Radioaktivität der Fraktionen Eluat und Beads stellt den gebundenen Anteil dar. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

Die RT-PCR-Produkte aus SELEX-Runde 9 wurden in den Klonierungsvektor pJET1.2 des „CloneJET PCR Cloning Kits“ eingebracht und in *E. coli* DH5α transformiert. Die Transformanten wurden vereinzelt, die Plasmide isoliert und mittels des Oligonukleotids pJET1.2R sequenziert. Aus den erhaltenen Plasmidsequenzen konnte die entsprechende Aptamersequenz anhand der bekannten flankierenden Oligonukleotidbindestellen identifiziert werden.

Es wurden 16 Klone zur Sequenzierung gegeben. Unter den insgesamt 11 erhaltenen Sequenzen wurden 10 unterschiedliche Sequenzen identifiziert, welche in Tabelle 16 aufgelistet sind. Von diesen 10 Sequenzen entstammten sechs der vollständig randomisierten RNA-Bibliothek. Die übrigen vier trugen den vorstrukturierten Stammschleifenbereich. Die Sequenz F4 war doppelt vertreten. In zwei Fällen kam es zu Abweichungen in der Länge der randomisierten Bereiche: bei den Sequenzen F9 und F13 waren diese 65 statt der vorgegebenen 64 Nukleotide lang.

Tabelle 16: Einzelsequenzen der Klone aus Runde 9.

Nr.	Randomisierter Bereich*	Länge [nt]	Häufigkeit
F2	GUAUUGGCCAGAUAAUGCUUAAUUCA <u>CUGCUUCGGCAG</u> GUUCGGGGCACAGUCCAGAGGGUGCC	64	1x
F3	UUCCCAGACUAUCUUUCCCAUACGCG <u>CUGCUUCGGCAG</u> GUUUGGGCACGCCAGAGGAUCGAACC	64	1x
F4	AAUACACCAAGCGACAAAGUCCCAAUCGAUUGGAUCCUC UGGAAAUAGCGGAGUGCAAGGUGGC	64	2x
F7	CAGUAUUUUGCGUCUGCGCGAAUACCUGGCCAUGCGCA AACAAAAGUCCGUUUCCAGGGCUGA	64	1x
F8	CGCGACAAUUCAGAGGGUGCGUGAUGUUUAGUGUGAG UUUCCCACCACCCUCUCUCCCCUGCCC	64	1x
F9	ACGCACCGAAGCAGGUUUCGGGGGA <u>CUGCUUCGGCA</u> <u>GA</u> AGAGGACCUGAAUCCAGAGUAGUGGA	65	1x
F10	AAUACACCAAGCGACAAAGUCCCAAUCGAUUGGAUCCCC AGGAAAUAGCGGAGUGCAAGGUGGC	64	1x
F11	AAUACACCAAGCGACAAAGUCCCAAUCGAUUGGAUCCUC UGGAAGUAGCGGAGUGCAAGGUGGC	64	1x
F13	ACGCACCGAAGCAGGUUUCGGGGG <u>ACUGCUUCGGCA</u> <u>GA</u> AGAGGACCUGAAUCCAGAGUAAUGGA	65	1x
F16	UUUGGCCGAUAUUGUGAUCCUCGAUGUGCCAGAGACG ACCUUACCAGAGGAUGCUGGCAUGAG	64	1x

*Angaben sind die RNA-Sequenzen der randomisierten Bereiche.

Der 5'-konstante Bereich lautet: 5'-GGGAGACGCAACUGAAUGAA-3'. Der 3'-konstante Bereich lautet: 5'-UCCGUAACUAGUCGCGUCAC-3'. Der vorgegebene Stammschleifenbereich ist fett hinterlegt und unterstrichen.

Die Primärstrukturanalyse umfasste weiterhin den Vergleich der Sequenzen untereinander, um konservierte Bereiche zu finden. Hierfür wurden frei zugängliche Sequenzanalyseprogramme im Internet genutzt (ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>; MEME, <http://meme-suite.org/tools/meme>). Es wurden zwei RNA-Familien identifiziert. Familie 1 wurde durch die Sequenzen F4, F10 und F11 repräsentiert, welche sich nur an drei Nukleotidpositionen unterschieden. Familie 2 wurde durch F9 und F13 repräsentiert, die nur eine Punktmutation unterschied. Eine Suche weiterer Motive mit MEME blieb indes erfolglos.

Familie 1: F4 (zweimal gefunden), F10 und F 11. Die variablen Nukleotide sind fett hervorgehoben und unterstrichen:

F4: AAUACACCAAGCGACAAAGUCCCAAUCGAUUGGAUCCUCUGGAAAUAGCGGAGUGCAAGGUGGC

F10: AAUACACCAAGCGACAAAGUCCCAAUCGAUUGGAUCCCCAGGAAAUAGCGGAGUGCAAGGUGGC

F11: AAUACACCAAGCGACAAAGUCCCAAUCGAUUGGAUCCUCUGGAAGUAGCGGAGUGCAAGGUGGC

Familie 2: F9 und F13. Die randomisierten Bereiche sind untereinander aufgelistet. Die variablen Nukleotide sind fett hervorgehoben und unterstrichen:

F9: ACGCACCGAAGCAGGUUCCGGGGGACUGCUUCGGCAGAAGAGGACCUGAAUCCAGAGUAGUGGA

F13: ACGCACCGAAGCAGGUUCCGGGGGACUGCUUCGGCAGAAGAGGACCUGAAUCCAGAGUAAUGGA

Die Sekundärstrukturanalyse erfolge über die „RNA Folding Form des mfold Web Servers (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA>). Der Server berechnet die mögliche RNA-Faltung mithilfe der minimalen freien Faltungsentnergie nach dem Algorithmus von Zuker (Zuker & Sankoff, 1984). In Abbildung 17 erfolgt die Darstellung der Faltung der Sequenz F10 aus Familie 1. Es ist ersichtlich, dass die Mutationen im Vergleich zu den Sequenzen F4 und F11 in einem ungefalteten Bereich lokalisiert sind, der zwischen zwei Haarnadelstrukturen liegt.

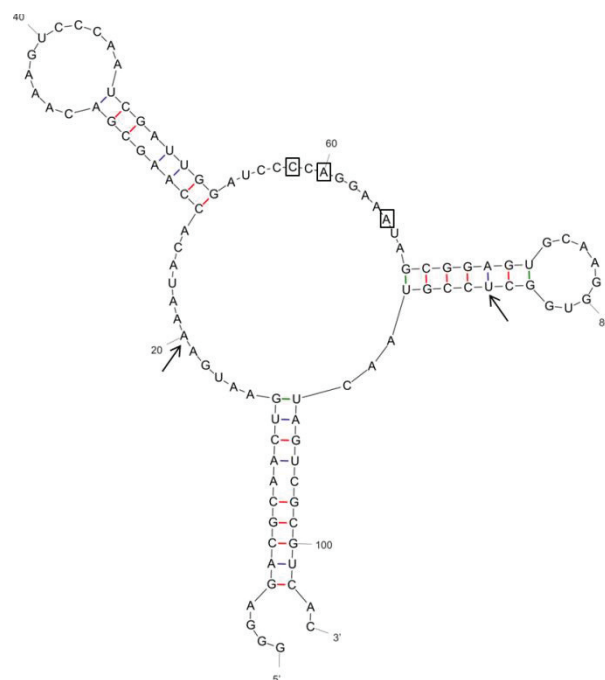


Abbildung 17: Vorhersage der Sekundärstrukturen der Sequenz F10 durch den Zuker-Algorithmus mittels mfold. Dargestellt ist die Struktur mit der geringsten Minimalen Freien Energie (MFE). Die variablen Nukleotide im Vergleich zu Sequenz F4 und F11 sind durch Kästen markiert. Die exakte Sequenz wird in Tabelle 16 wiedergegeben. Das Ende des 5'- und der Anfang des 3'-konstanten Bereiches ist durch einen Pfeil markiert.

4.3.4 Bindungsstudien individueller Aptamerklone

Die Einzelsequenzen wurden mit den Oligonukleotiden pSP_FWD_NheI und pSP_REV_EcoRI (siehe Tab. 9) amplifiziert. Die Amplifikate der Einzelklone wurden in pSP64 kloniert. Nach der Linearisierung mit EcoRI erfolgte die radioaktive Transkription. Klon F3 enthielt eine intrinsische EcoRI-Schnittstelle und wurde in diesem Ansatz nicht weiter untersucht. Für Bindungsstudien wurden je 20.000 counts der radioaktiv transkribierten Aptamerkandidaten den bereits in Kapitel 4.3.2 beschriebenen und in Abbildung 15 dargestellten Bindungsstudien unterzogen. Die Ergebnisse der konventionellen Bindungsstudien sind in Abbildung 18 gezeigt. Für die Sequenzen F2, F8, F9, F13 und F16 wurde keine Bindung an den mit TH72-Biotin derivatisierten Beads festgestellt (Bindung $\leq 0,2\%$). Ebenso F7 zeigte mit 1,9% eine vernachlässigbare Interaktion mit diesen Beads. Nur die Klone F4, F10 und F11, welche der identifizierten Familie 1 entstammten, zeigten eine signifikante Bindung, wobei diese bei F10 am stärksten ausgeprägt war (10,3%). Diese drei Sequenzen zeigten keine Bindung an nicht derivatisierte Beads (Daten nicht gezeigt). Es wurde sich dafür entschieden, Aptamer F10 näher zu charakterisieren.

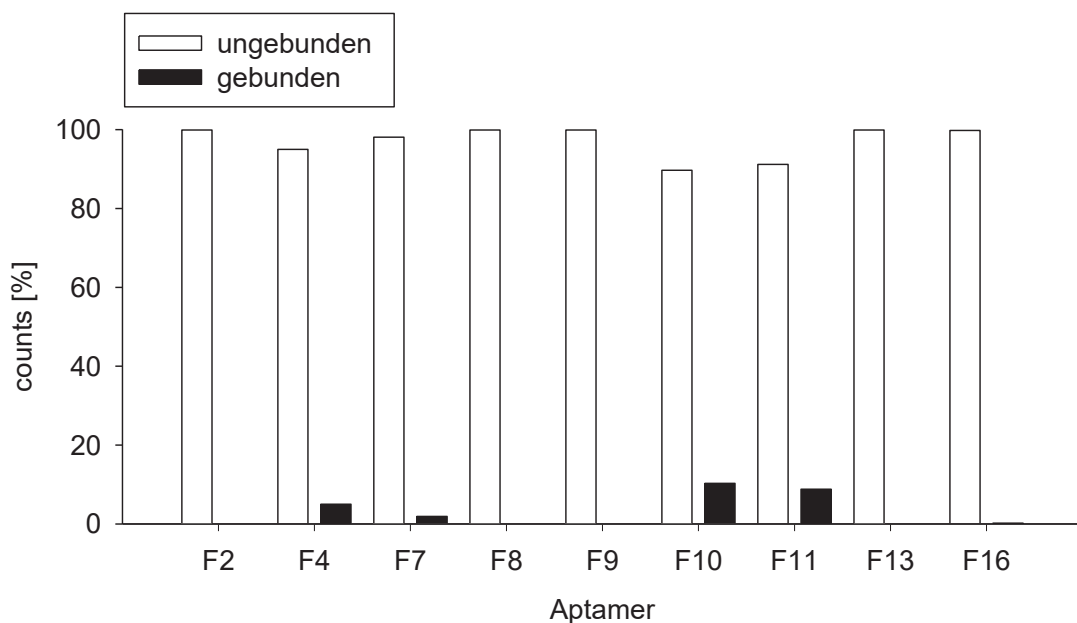


Abbildung 18: Bindungsstudien der einzelnen Aptamerklone F2–F16. Die radioaktiv markierten Sequenzen wurden konventionellen Bindungsstudien an Beads, welche mit TH72-Biotin derivatisiert waren, unterzogen. Die Bindungsstudien wurden in Einzelmessungen durchgeführt.

4.3.5 Bindungsstudien mit Aptamer F10

Es sollte im Anschluss untersucht werden, ob die Sequenz F10 in der Lage war, neben dem immobilisierten Aptamer TH72-Biotin auch das freie TH72 (siehe Tab. 15) zu erkennen. Hierzu wurden die in Abbildung 15 beschriebenen Konkurrenzexperimente durchgeführt. Die

radioaktiv markierte RNA F10 wurde vor der Zugabe zu den derivatisierten Beads mit verschiedenen Konzentrationen an freiem Azobenzol TH72 inkubiert. Die Ausbildung eines RNA-Ligandenkomplexes sollte dabei die Bindung der RNA an die derivatisierten Beads unterbinden. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, kam es durch die Zugabe von TH72 ab einer Konzentration von 0,1 mM zu einer sichtbaren Verminderung des Anteils Beads-bindender RNA. Der Anteil verminderte sich weiter und erreichte bei Zugabe von 1 mM TH72 nur noch 23% des Wertes der Referenzmessung ohne Konkurrenz (0 mM TH72: 9,1% Bindung; 1 mM TH72: 2,1% Bindung). Es ist daher zu mutmaßen, dass freies TH72 eine Interaktion mit der Aptamersequenz F10 eingehen kann.

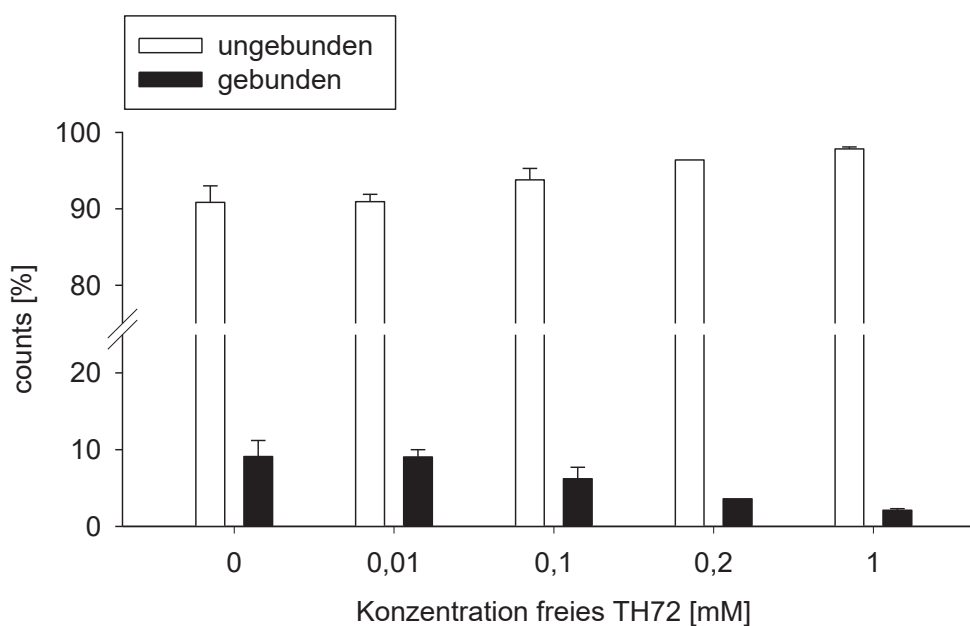


Abbildung 19: Kompetitionsstudien der Aptamersequenz F10. Bei diesen den konventionellen Bindungsstudien ähnlichen Tests wurden ansteigende Mengen von freiem TH72 zu den Ansätzen gegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

Für Aptamer F10 sollte außerdem geprüft werden, ob die Spezifität der Bindung abhängig vom Photoisomerisierungszustand des immobilisierten Azobenzols TH72-Biotin war. Bei allen bisherigen Bindungsstudien wurde die *trans*-Form eingesetzt, welche bei Raumtemperatur und Tageslicht stets vorherrschend war (persönliche Kommunikation T. Halbritter). Zur Überprüfung der Photoisomer-abhängigen Bindung an die derivatisierten Beads wurden diese je 1 min mit UV_{365 nm} (200 mA und 13,5 V; Gerät UVLED 365; Bonn) oder mit 1 min UV_{365 nm} + 1 min Weißlicht (LED LENSER® - T7) bestrahlt (siehe Abb. 20).

Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien unter verschiedenen Belichtungsbedingungen sind in Abbildung 21 dargestellt. Durch die einminütige UV-Bestrahlung der TH72-Biotin-Beads verminderte sich die Bindung des Aptamers F10 auf 22,4% im Vergleich zu den Bindungstests

auf unbestrahlten Beads. Eine direkt darauffolgende, ebenfalls einminütige Bestrahlung mit Weißlicht konnte die Bindung von F10 an die Beads zu einem Großteil wiederherstellen (85% Bindung). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Aptamer F10 in der Lage war, zwischen den Photoisomeren des immobilisierten Azobenzols TH72-Biotin zu unterscheiden und spezifisch die *trans*-Form zu erkennen. Die Bindung des freien Azobenzols TH72 durch die RNA F10 wird im folgenden Abschnitt mittels der ITC-Messmethode untersucht.

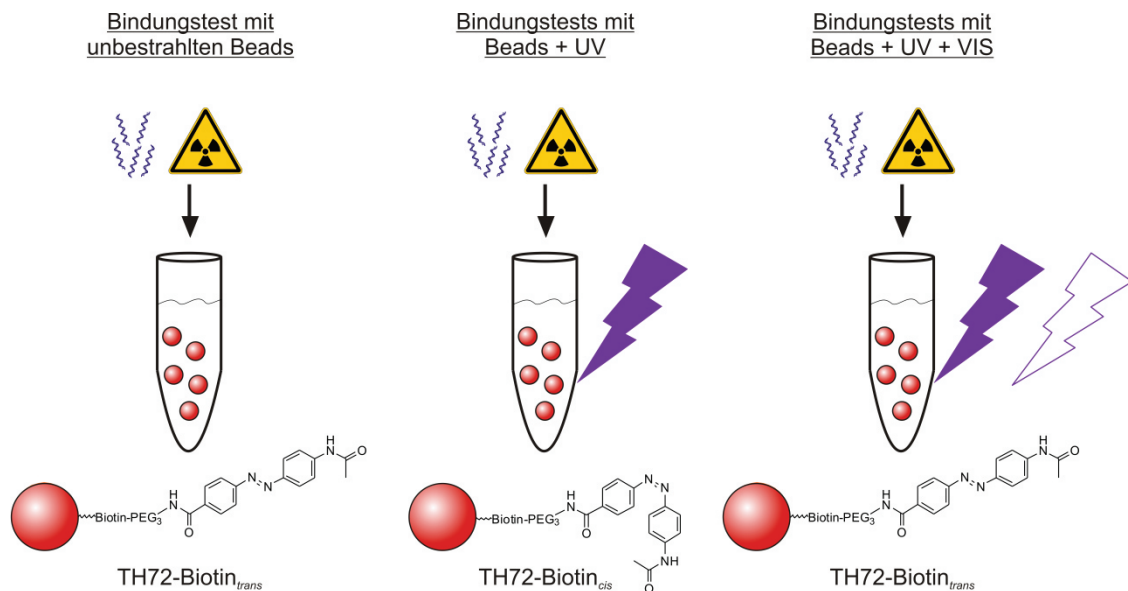


Abbildung 20: Durchführung zur Analyse der Photoisomer-abhängigen Bindung radioaktiv markierter Aptamersequenzen an die mit TH72-Biotin derivatisierten Beads. Links: Konventioneller Bindungstest mit unbestrahlten Beads, bei welchen das immobilisierte Azobenzol mehrheitlich in der *trans*-Form vorlag. Mitte: Bindungstest an Beads, welche 1 min mit UV_{365 nm} bestrahlt wurden, wodurch TH72-Biotin mehrheitlich in *cis* vorlag. Rechts: Die *cis*-Form wurde durch Weißlicht wieder in *trans* überführt. Erkennt die RNA tatsächlich nur das *trans*-Isomer, so findet eine Bindung nur im ersten und im letztgenannten Fall statt.

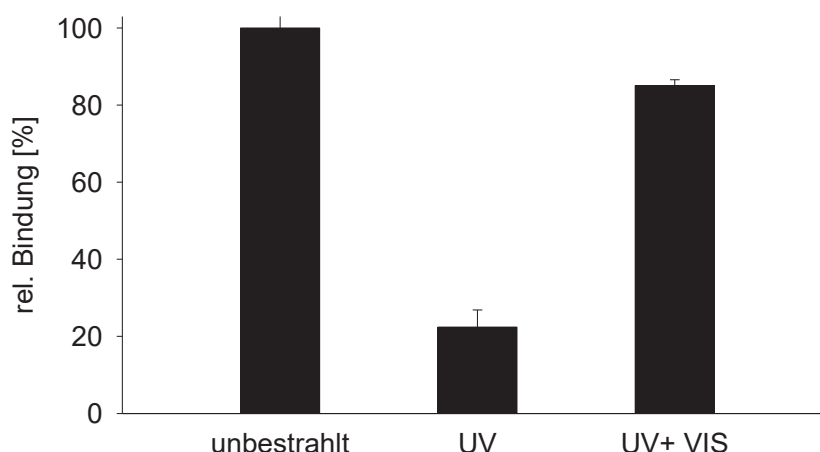


Abbildung 21: Bindungstests des radioaktiv markierten Aptamers F10 an mit TH72-Biotin derivatisierte Beads, welche entweder unbestrahlt vorlagen (= mehrheitlich *trans*-Form) bzw. mit UV_{365 nm} (= mehrheitlich *cis*-Form) oder mit UV_{365 nm} + VIS bestrahlt wurden (= mehrheitlich *trans*-Form). Die Ergebnisse wurden auf die Referenzmessung mit den unbestrahlten Beads normiert. Die Rohdaten werden im Anhang in Tabelle 25 gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

4.3.6 Isotherme Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Bindeaffinität zwischen Aptamer F10 und TH72

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen RNA-Molekülen und potentiellen Liganden wurde in dieser Studie stets das Mikrokalorimeter „MicroCal iTC200“ verwendet.

Die Messzelle wurde mit 0,2 ml der RNA-Lösung von Aptamer F10 (10 µM) befüllt. Die Spritze enthielt 100 µM des Liganden TH72. Sowohl die RNA als auch der Ligand wurden in dem in der SELEX verwendeten PBS-Waschpuffer (siehe Tab. 8) gelöst. Die DMSO-Konzentrationen wurden in der RNA- und Titrantenlösung exakt gleich eingestellt, um unspezifischen Verdünnungseffekten vorzubeugen. Die Messungen erfolgten bei 37°C.

Nach einer Präequilibrierung und einem initialen Verzug von 180 s erfolgte eine erste Injektion von 0,2 µl, gefolgt von 15 Injektionen von je 2,5 µl im zeitlichen Abstand von je 180 s. Die Geschwindigkeit des Rührers der Probeninjektionsspritze wurde auf 1000 rpm festgesetzt. Die Referenzleistung betrug 6 µcal/s. Die Rohdaten wurden mithilfe der Origin 7.0 Software ausgewertet. Durch Integration wurde die freigesetzte Wärmemenge erhalten, die gegen das steigende molare Verhältnis von Ligand zu RNA aufgetragen wurde. Zur Korrektur von Verdünnungseffekten wurde eine ITC-Messung durchgeführt, bei welcher der Puffer (ohne Ligand) in die RNA-Lösung titriert wurde (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 22 ersichtlich ist, führten die einzelnen Titrationsschritte zu äußerst geringen Ausschlägen bei den Wärmeumsätzen. Dadurch konnte keine sigmoidale theoretische Kurve an

diese Daten angepasst werden, über die normalerweise die Bindeparameter ΔH , ΔS , n und die Bindungskonstante K_a erhalten werden. Die RNA-Lösung wurde diversen Faltungsprogrammen unterzogen (5 min erhitzen bei 70 oder 95°C, 5 min auf Eis abkühlen, Zugabe von Puffer und Inkubation für 15 min bei RT). All diese Versuche zeigten jedoch vergleichbare Messwerte (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung, ob das Aptamer die Linker-Einheit aus PEG₃ und Biotin zur Bindung benötigte, wurden Titrations mit TH72-Biotin durchgeführt. Diese lieferten jedoch ebenfalls kein Ergebnis. Es lässt sich daher aussagen, dass das RNA-Aptamer F10 nicht in der Lage war, das freie Azobenzolderivat TH72 bzw. TH72-Biotin zu binden. Es ist wahrscheinlich, dass zur Erkennung des Aptamers weitere Bestandteile des Beads-Komplexes (insbesondere Streptavidin) nötig waren.

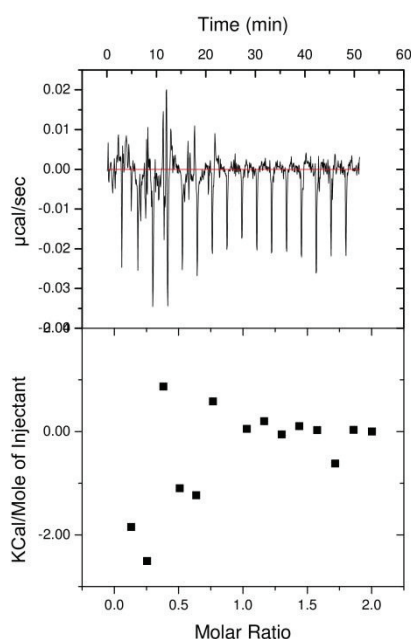


Abbildung 22: Ergebnisse der isothermen kalorimetrischen Titration des Aptamers F10 (10 µm) mit 100 µM TH72_{trans}. Der obere Graph zeigt die Rohdaten der Titration. Der untere Graph zeigt die durch Integration der Peaks erhaltenen Wärmeumsätze in kcal/mol pro Injektion, aufgetragen gegen das molare Verhältnis aus Ligand/RNA.

4.4 ***In vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen Azobenzole mittels säulenbasierter Affinitätschromatographie**

Im vorhergehenden Kapitel wurde demonstriert, dass durch die Dynabeads[®]-Methode Aptamere erhalten wurden, die nicht in der Lage waren, das freie Zielmolekül zu binden. Dies könnte auf die Anwesenheit von Streptavidin zurückzuführen sein, welches möglicherweise an der RNA-Ligandeninteraktion beteiligt ist (siehe Diskussion im Kapitel 5.1.2). In einem neuen Ansatz wurde nun die konventionelle SELEX-Methode durchgeführt, welche auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie basiert. Die Durchführung dieses Verfahrens zur *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen das Azobenzol TH-CA wird im Folgenden dargestellt.

4.4.1 **Immobilisierung an eine aktivierte Gelmatrix**

Zur Immobilisierung wurde Affi-Gel 10 (Bio-Rad) verwendet, welches sich aus N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Ester-derivatisierten Agarosepartikeln zusammensetzt. Die aktivierten Ester erlauben eine hocheffiziente und spezifische Kopplung von Liganden mit primären Alkyl- oder Aryl-Aminogruppen. Aus diesem Grunde wurde das Azobenzolderivat TH-CA durch T. Halbritter mit einem Aminolinker versehen (TH-CA-Amino, siehe Tab. 15). Zur Vorbereitung der Kopplung wurden 20 ml Säulenmaterial (Kapazität 15 $\mu\text{mol/ml}$ Gel) durch eine zuvor mit H_2SO_4 und MQ- H_2O gereinigte Glasfritte filtriert und mit eiskaltem Isopropanol gewaschen. 7,5 ml Säulenmaterial wurden mit DMSO auf 10 ml aufgefüllt und mit 5 ml 3 mM TH-CA-Amino (gelöst in 100% DMSO) versetzt. Die Konzentration des zu koppelnden Azobenzols lag somit bei 1 mM. Das Gemisch wurde 4 h bei RT auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend durch die Glasfritte filtriert und zweimal mit DMSO gewaschen. Zur Deaktivierung verbleibender NHS-Ester wurde das Säulenmaterial mit 5 ml 0,1 M Ethanolamin pH 8,0 versetzt und 1 h bei RT auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Das derivatisierte Affi-Gel 10 wurde mehrmals mit DMSO gewaschen und schließlich 1:1 mit MQ- H_2O (+ 0,002% Natriumazid) gemischt. Je 1 ml des Gemischs wurden in Chromatographiesäulen (1,2 ml Bettvolumen; Bio-Rad) gegeben und bei 4°C gelagert. Für die Vorsäulen, welche zur Negativselektion eingesetzt wurden, wurde das oben beschriebene Protokoll verwendet, wobei nur der zweite Kopplungsschritt mit Ethanolamin vollzogen wurde.

4.4.2 **Durchführung der ersten Runde der *in vitro*-Selektion**

Nach der erfolgreichen Herstellung der derivatisierten Chromatographiesäulen konnte mit der *in vitro*-Selektion begonnen werden. Die im Folgenden beschriebene Durchführung wird in Abbildung 23 schematisch dargestellt.

Für die initiale Runde des SELEX-Prozesses wurden 2 nmol (entspricht $\sim 1,2 \cdot 10^{15}$ Sequenzen) der unmarkierten RNA-Bibliotheken (1:1-Verhältnis der randomisierten zur vorstrukturierten Bibliothek) mit 250.000 counts der radioaktiv markierten RNA-Bibliotheken (5'-phosphoryliert) in

250 µl MQ-H₂O gemischt und einem Faltungsprogramm unterzogen. Die RNA-Lösung wurde dazu 5 min bei 95°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden 100 µl 5x SELEX-Puffer (siehe Tab. 8), 6 µl Hefe-tRNA (Endkonzentration 0,3 µg/µl) und 144 µl MQ-H₂O hinzugeben. Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde die Vor- und Hauptsäule jeweils mit 10 Volumen 1x SELEX-Puffer gewaschen. Ein Volumen (Vol.) bezieht sich dabei auf das Säulenvolumen und beträgt 500 µl. Ein Waschschritt entspricht, falls nicht anders angegeben, einem Säulenvolumen. Die RNA-Lösung wurde auf die Vorsäule (derivatisiert mit Ethanolamin) appliziert, deren Durchfluss auf die direkt darunter angebrachte Hauptsäule (derivatisiert mit 1 mM TH-CA-Amino) gelangte. Hierbei handelte es sich um einen Negativselektionsschritt, welcher alle matrixbindenden RNA-Spezies entfernen sollte. Nach zweimaligem Waschen der Vorsäule mit 1x SELEX-Puffer wurde die Hauptsäule mit der an ihr verbleibenden RNA-Lösung 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Hauptsäule 10x mit 500 µl 1x SELEX-Puffer gewaschen. Die Elution der an der Hauptsäule verbleibenden RNA erfolgte durch 4 Vol. 20 mM EDTA (gelöst in 1x SELEX-Puffer). Alle Durchläufe wurden separat in Reaktionsgefäßen gesammelt. Je 10 µl der einzelnen Durchläufe bzw. der Gelmatrix von Vor- und Hauptsäule wurden mit 2 ml Szintillationscocktail versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen.

Die gesamte Elutionsfraktion der ersten SELEX-Runde wurde einer ethanolischen Fällung mit Natriumacetat in Anwesenheit von 15 µg GlycoBlue unterzogen (siehe Kapitel 3.6.3) und schließlich in 50 µl MQ-H₂O gelöst. Die RT-PCR erfolgte durch Zugabe von 48 µl 2x-RT-PCR-Mix (siehe Tab. 8), 1 µl Taq-Polymerase und 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase. Das RT-PCR-Produkt wurde auf einem 3%-igem Agarosegel überprüft. Die Anzahl der RT-PCR-Zyklen wurden so angepasst, dass das Amplifikationsprodukt auf dem Agarosegel eine vergleichbare Intensität wie die 0,1 kb-Bande der eingesetzten Ultra Low Range DNA-Leiter II (siehe Tab. 5) aufwies. Zur Herstellung radioaktiv markierter RNA für die folgende SELEX-Runde wurden 10 µl der RT-PCR-Reaktion mit 87 µl TK-Mix, 3 µl T7-RNasin-Mix (siehe Tab. 8) und 1 µl [α -³²P] UTP [3000 Ci/mmol] versetzt. Nach einer Inkubation für 2 h bei 37°C wurde der Ansatz über eine Präzipitation mit Ammoniumacetat (siehe 3.6.12) aufgereinigt und im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen.

In allen folgenden SELEX-Runden wurden 500.000 counts der radioaktiv transkribierten RNA eingesetzt und demselben Faltungsprogramm wie dem oben beschriebenen unterzogen. Es wurde für jede Runde derselbe Ablauf eingehalten. Das Protokoll in den einzelnen SELEX-Runden unterschied sich nur hinsichtlich der ausgeübten Stringenz und der Elutionsmethoden, wie in Kapitel 4.4.3 gezeigt wird.

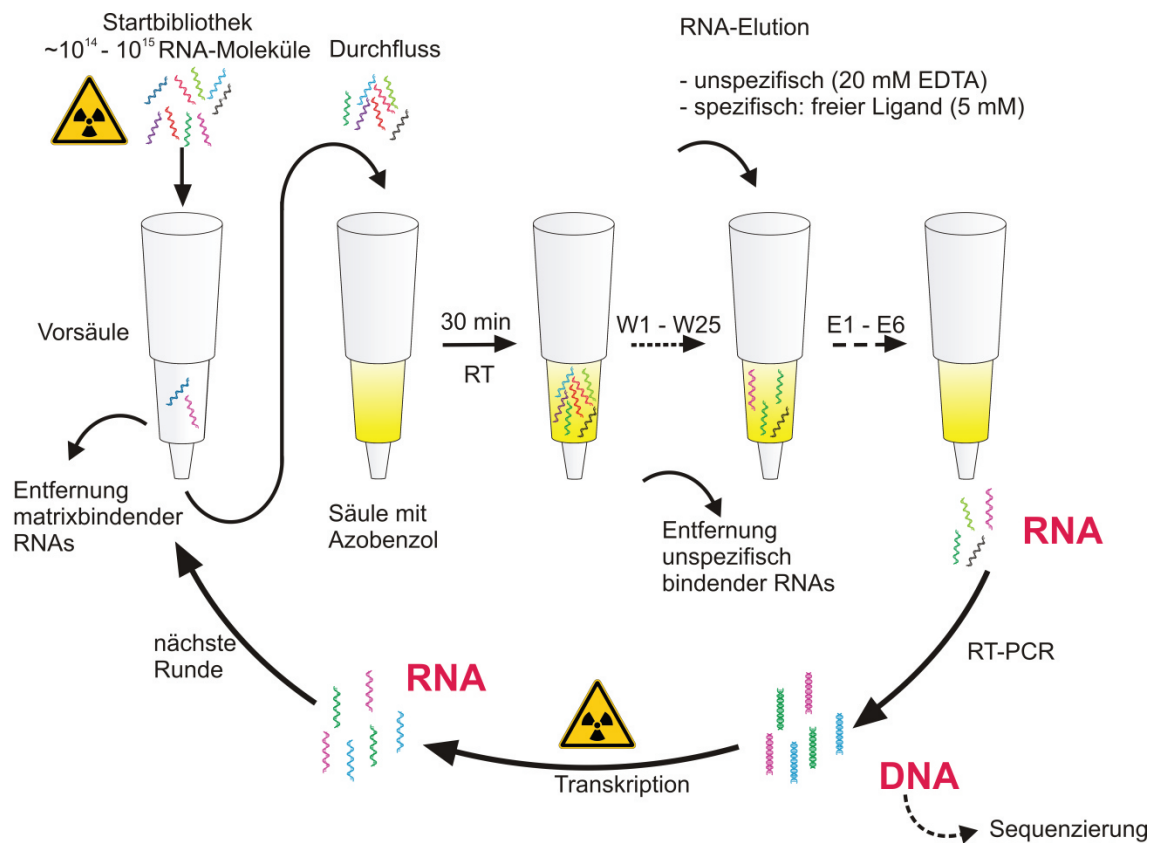


Abbildung 23: Schematische Darstellung der *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen Azobenzole unter Verwendung der säulenbasierten Affinitätschromatographie. Alle Schritte erfolgten bei RT. W1–W25 = Waschschritte. E1–E6 = Elutionen. Die einzelnen Schritte werden ausführlich im Text beschrieben.

4.4.3 Weiterer Verlauf der *in vitro*-Selektion

Der Gesamtverlauf der *in vitro*-Selektion über neun Runden ist in Abbildung 24 gezeigt. Das zugrundeliegende Protokoll wird in Tabelle 17 detailliert wiedergegeben.

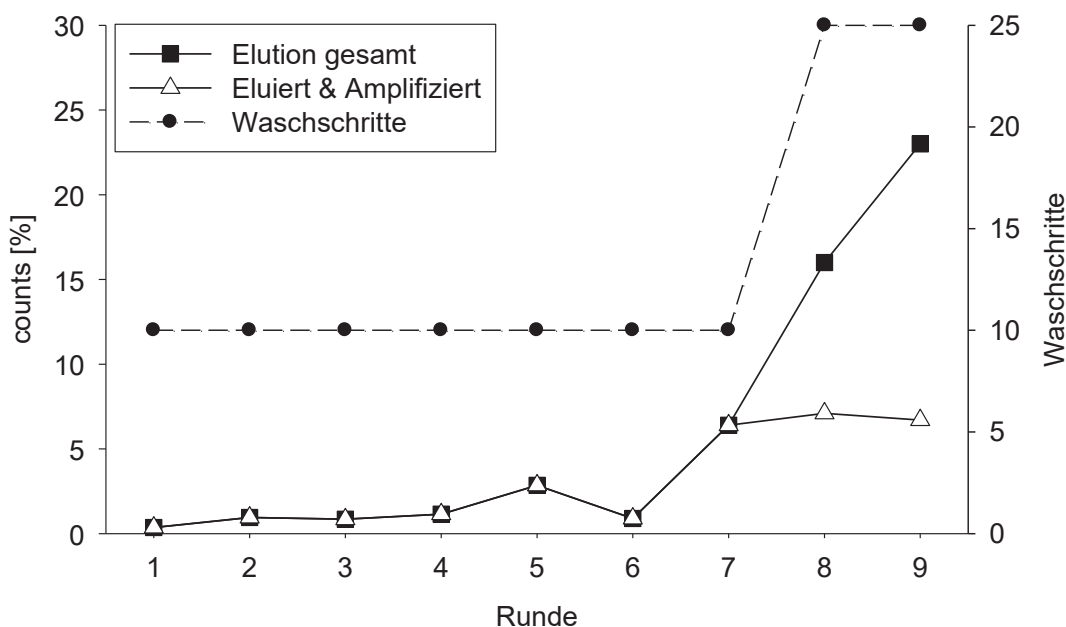


Abbildung 24: Verlauf der *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen TH-CA über neun Runden. Die schwarzen Quadrate symbolisieren den Anteil der radioaktiv markierten RNA an der insgesamt eingesetzten RNA, der nach der jeweiligen Zahl von Waschschrirten (schwarze Kreise) an der Säule verblieb und unspezifisch (20 mM EDTA) oder spezifisch (5 mM TH-CA) eluiert werden konnte. Die weißen Dreiecke symbolisieren den Anteil der radioaktiv markierten RNA, welche tatsächlich zur Amplifizierung für die nächste SELEX-Runde (bzw. zur Sequenzierung in der letzten Runde) eingesetzt wurde.

Die RNA-Bibliothek zeigte anfänglich keine spezifische Affinität für das immobilisierte Zielmolekül (0,4% Bindung in Runde 1). Die Negativselektionsschrirte wurden in den ersten drei SELEX-Runden durchgeführt, ab Runde 4 wurde die vorbereitete RNA-Lösung dann direkt auf die Hauptsäule gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Während der Runden 1–5 wurden unspezifisch bindende RNA-Moleküle durch zehn Waschschrirte mit 1x SELEX-Puffer entfernt und die verbleibende RNA wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA (gelöst in 1x SELEX-Puffer) eluiert. Dies sollte in den ersten Runden eine Elution aller bindenden RNA-Spezies garantieren. Ab Runde 5 konnte dann erstmals ein Anstieg in der RNA-Bindung an das derivatisierte Säulenmaterial festgestellt werden (2,9%). Fortan wurde sich daher für spezifische Affinitätselutionen mit 6 Vol. 5 mM TH-CA in 1x SELEX-Puffer entschieden, was in Runde 6 mit einem Rückgang der Elutionsfraktion einherging. Ab Runde 7 war schließlich ein deutlicher

Anstieg der RNA-Bindung (6,9%) zu verzeichnen. Daraufhin wurde die Stringenz erhöht. Hierzu wurde die Anzahl der Waschschrte auf 25 angehoben. Zudem erfolgten fünfminütige Präelutionen mit 5 mM TH-CA in 1x SELEX-Puffer. Dieses Präeluat wurde verworfen, da es RNA-Spezies enthielt, welche schnell von der Säule dissoziierten. In Runde 8 wurden zwei dieser Präelutionsschritte durchgeführt. Die Dauer der vier Hauptelutionen wurde gleichzeitig auf 30 min erhöht, um die Elution hochaffiner RNA-Spezies gewährleisten zu können (siehe Diskussion in Kapitel 5.1.3.1). Der Anteil der eluierten RNA an der insgesamt eingesetzten RNA erhöhte sich auf 16%, wovon 7,1% den Präelutionsschritten standhielten. In Runde 9 wurden drei fünfminütige Präelutionen durchgeführt. Diese konnten von 6,7% der RNA-Moleküle der Gesamtelutionsfraktion (23%) überdauert werden. Aus dem Verlauf der Selektion von Runde 1–9 wird eindeutig ersichtlich, dass es zu einer Anreicherung spezifisch bindender RNA-Spezies gekommen ist. Nach Runde 9 wurde sich dafür entschieden, die SELEX zu beenden und den Pool näher zu charakterisieren.

Tabelle 17: Protokoll der *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen TH-CA durch säulenbasierte Affinitätschromatographie

Runde	Wasch-schritte ^a	Anzahl Präelu-tionen ^b	Anzahl Haupt-eluti-onen	Art der Elution	Dauer jeder Haupt-elution ^c	Elution gesamt [%] ^d	Eluiert + Ampli-fiziert [%] ^d
1	10	-	4	EDTA	-	0,4	0,4
2	10	-	4	EDTA	-	1,0	1,0
3	10	-	4	EDTA	-	0,9	0,9
4	10	-	4	EDTA	-	1,2	1,2
5	10	-	4	EDTA	-	2,9	2,9
6	10	-	6	TH-CA	5 min	0,9	0,9
7	10	-	6	TH-CA	5 min	6,4	6,4
8	25	2	4	TH-CA	30 min	16,0	7,1
9	25	3	4	TH-CA	30 min	23,0	6,7

^a Ein Waschschrte entsprach einem Säulenvolumen = 500 µl 1x SELEX-Puffer

^b Jeder Präelutionsschrte wurde 5 min mit je einem Säulenvolumen 1x-SELEX-Puffer mit 5 mM TH-CA durchgeführt.

^c Alle Hauptelutionsschritte wurden mit je einem Säulenvolumen 1x-SELEX-Puffer mit 5 mM TH-CA durchgeführt. Sie erfolgten entweder als Durchfluss oder wurden für die in der Tabelle angegebene Dauer auf der Hauptsäule inkubiert.

^d Das radioaktive Profil der einzelnen Runden der *in vitro*-Selektion, welches als Berechnungsgrundlage des Anteils der Eluatfraktion diente, ist in Tabelle 26 im Anhang gezeigt.

4.4.4 Sequenz- und Strukturanalyse

Zur Sequenzanalyse wurden die RT-PCR-Produkte aus Runde 9 in den Vektor pCR4-TOPO® subkloniert. Es wurden 32 Klone zur Sequenzierung gegeben. Unter den insgesamt 27 erhaltenen Sequenzen wurden 16 unterschiedliche Sequenzen identifiziert, welche in Tabelle 18 aufgelistet sind. Von diesen 16 Sequenzen entstammten lediglich zwei der vollständig randomisierten RNA-Bibliothek, wohingegen die übrigen den vorgegebenen Stammschleifenbereich trugen. Die Sequenzen 34 und 45 waren mit sechs- bzw. viermal am häufigsten vertreten. Jeweils doppelt kamen die Sequenzen 35, 37 und 38 vor. In über zwei Drittel der Fälle hatten die randomisierten Bereiche die vorgegebene Länge von 64 Nukleotiden, es kam jedoch auch zu Abweichungen (56, 63 und 65 Nukleotide).

Tabelle 18: Einzelsequenzen der Klone aus Runde 9.

Nr.	Randomisierter Bereich*	Länge [nt]	Häufigkeit
33	AACAAUAGGAGCCAGAGUUGUUUUCU <u>CUGCUUCGGCAG</u> AAACGGAUGUAAGGGACCUAUAACCA	64	1x
34	CUGUGCAAAAGCAAAAUUCGGCGUUC <u>CUGCUUCGGCA</u> <u>G</u> AGACGUAAACACGACACAGGGGUAGAA	65	6x
35	CGCUCUGGUAGCGUCAACACCCUAAGUGGAGGGGUGG CCCGAAGACCCGGGAUAUAUGGUACUA	64	2x
37	CGUGGUCGAACUUCAACCACGUCAA <u>CUGCUUCGGCAGG</u> CCCUAGGCUAGUAUUCGAGUAAUGA	63	2x
38	UACUGCAAUGGGCAGUUUGGAAACCU <u>CUGCUUCGGCAG</u> CCGCCCCGGGUUCACACGGGAGAGCUU	64	2x
39	GCUAGGCUAAAAAGCUGCGAAGUCUA <u>CUGCUUCGGCAG</u> CGCCCCGUAAGAAACUGUAACGGUUA	64	1x
41	UUGUAGAGAAAUGCCUCUGCAAUCA <u>CUGCUUCGGCAG</u> GCCCAAGGACCAGAUACA	56	1x
42	UGUCGGAAGUAGCACAGUUGACCCUA <u>CUGCUUCGGCAG</u> GCCUACGGGAAAGGUAACGGAGCCGC	64	1x
43	CCAAGAGCCAAGGGAGGACACGUCGU <u>CUGCUUCGGCAG</u> AUACCAGGGGACUGCAGAAAACGUA	63	1x
45	GUCUAGGAUUAGUUCGGCACUGUGA <u>CUGCUUCGGCA</u> <u>G</u> UAAAGCAAACAAGCCCCGUAGAGGAC	64	4x

48	UGCCGGUGUUACAUGGAAGAGCCACC <u>CUGCUUCGGCAG</u> CGCACGUGAACCUAGGGACUUACGGU	64	1x
49	CUGACCAUAAAAUCAGUCAACCACGCC <u>CUGCUUCGGCAG</u> CCGUAGGGCCCAAGAACUAGUGACUG	64	1x
51	AUCGGCGAACAAAAGAAAACAUUUAU <u>CUGCUUCGGCAG</u> GGUCGGCAGGCAAGUAGGCUGGAGCC	64	1x
60	CUGAAAGGAGCCAAUUCAGUAUUUCAG <u>CUGCUUCGGCA</u> <u>GGCUAUGACACGGUAAGGGACCCAAU</u>	65	1x
61	CCAUUCCGCGCUGCGGAAGGUCAACC <u>CUGCUUCGGCAG</u> AUGGGCCCGGGCUAGCCGGACAAAAA	64	1x
64	CGUGAAUUUCCGGCGUCUAUCAGAUCCGACCCGUUCAA AUGCAUGAAAAGAAAUUCGGUGUGAG	64	1x

*Angegeben sind die RNA-Sequenzen der randomisierten Bereiche.

Der 5'-konstante Bereich lautet: 5'-GGGAGACGCAACUGAAUGAA-3'. Der 3'-konstante Bereich lautet: 5'-UCCGUAACUAGUCGCGUCAC-3'. Der vorgegebene Stammschleifenbereich ist fett hinterlegt und unterstrichen.

Durch den Vergleich der Aptamersequenzen untereinander ließen sich keine konservierten Bereiche identifizieren. Auch die Motivsuche mit MEME blieb erfolglos. Es wurden daher alle RNA-Sequenzen Bindungsstudien unterzogen.

4.4.5 Analyse individueller Aptamerklone durch säulenbasierte Bindungsstudien

Die Analyse des Bindungsverhaltens individueller Aptamerklone wurde analog den verwendeten SELEX-Bedingungen durchgeführt. Die Einzelsequenzen wurden mit den Oligonukleotiden pW_FWD_KpnI und pW_REV_HindIII (siehe Tab. 9) amplifiziert. Die Amplifikate der Einzelklone wurden radioaktiv transkribiert und die RNA (je ~250.000 counts) wurde nach dem Faltungsprogramm (Gesamtvolumen 500 µl, in 1x SELEX-Puffer + 0,3 µg/µl Hefe-tRNA) auf die azobenzolderivatisierten Säule appliziert. Nach einer Inkubation für 30 min bei RT folgten fünf Waschschrte mit je 1 ml 1x SELEX-Puffer und sechs Elutionen mit 2,5 mM TH-CA in 1x SELEX-Puffer. In Abbildung 25 wird für die 16 Aptamere der Anteil der radioaktiven RNA an der eingesetzten Gesamt-RNA gezeigt, der nach den Waschschrten spezifisch eluiert werden konnte. Da die Elutionen im Gegensatz zur eigentlichen SELEX nur als Durchfluss erfolgten und somit langsam dissoziierende RNA-Moleküle möglicherweise nicht eluiert werden konnten, wurde auch der an der Säule verbleibende radioaktive Anteil mit in die Gesamtbindung eingerechnet. Die Einzelklone zeigten ein unterschiedliches Bindeverhalten. Die Klone 35, 37,

41, 43, 49 und 61 wiesen eine sehr geringe Bindung auf (unter 5%). Klon 34 zeigte mit 21,6% die stärkste Bindung, gefolgt von den Klonen 48, 64, 42 und 45. Diese fünf Klone mit den besten Bindeeigenschaften wurden in nachfolgenden Experimenten näher charakterisiert.

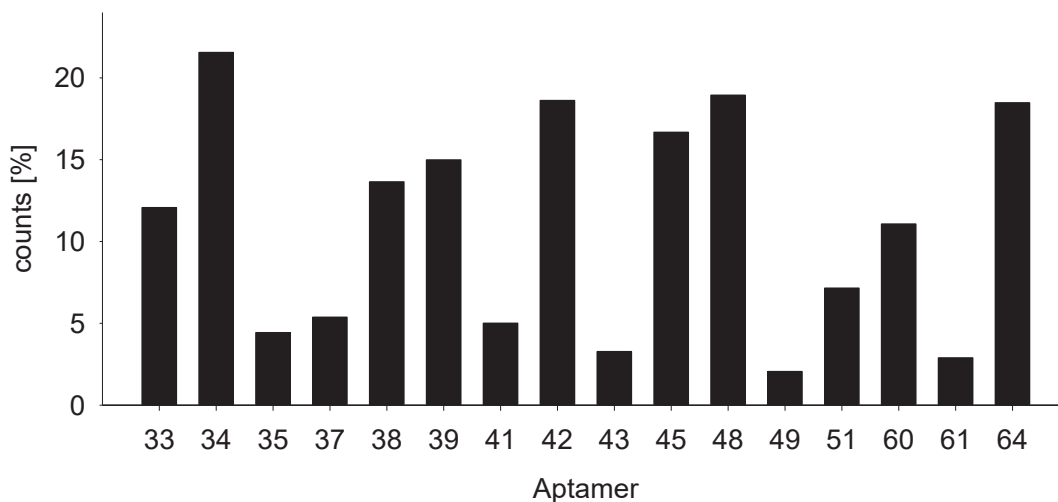


Abbildung 25: Bindungsstudien der einzelnen Aptamerklone 33–64. Die radioaktiv markierten Einzelklone wurden analog zum SELEX-Prozess auf die mit TH-CA-Amino derivatisierten Säulen appliziert, fünfmal mit 1x SELEX-Puffer gewaschen und anschließend mit 6 Vol. 1x SELEX-Puffer inkl. 2,5 mM TH-CA eluiert. Angezeigt ist der Anteil der RNA an der insgesamt applizierten RNA, welche eluiert werden konnte bzw. noch an den Säulen verblieb. Die Bindungsstudien wurden in Einzelmessungen durchgeführt.

Im nächsten Schritt sollte nachgewiesen werden, ob die identifizierten Aptamere eine spezifische Bindung mit dem Azobenzol TH-CA-Amino eingingen oder ob auch die nicht derivatisierte Matrix gebunden wurde. Diese Bindungsstudien sind in Abbildung 26 schematisch dargestellt. Darüber hinaus wurde durch Kompetitionsstudien getestet, ob die RNA-Aptamere den freien, nicht immobilisierten Liganden TH-CA erkannten. Dazu wurden die radioaktiv markierten Aptamere direkt nach ihrer Erhitzung auf 95°C und Abkühlung auf Eis mit 1 mM TH-CA in 1x SELEX-Puffer versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Das RNA-Azobenzolgemisch wurde daraufhin analog zu den konventionellen Bindungsstudien auf die mit TH-CA-Amino derivatisierten Säulen appliziert. Es galt die Annahme, dass bei Bindung zwischen der RNA und dem freien Liganden sich deren Bindung an die derivatisierte Matrix verringert und die RNA-Ligandenkomplexe bereits bei den ersten Waschschritten von der Säule entfernt werden. Daher wurde ein niedrigerer Anteil der RNA in der Elutionsfraktion erwartet.

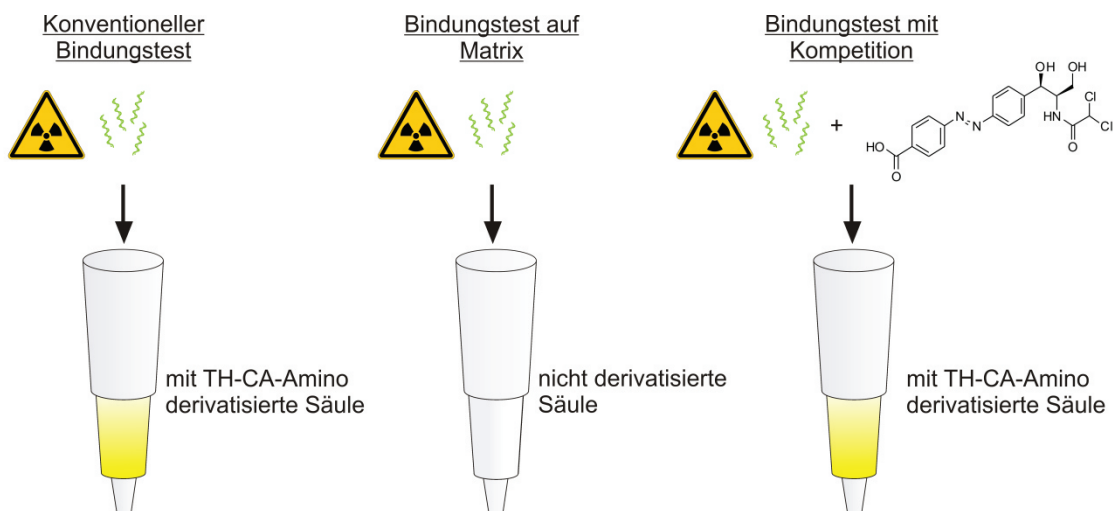


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Validierungsexperimente zur Bestimmung der Bindungsspezifität der einzelnen Aptamerkandidaten. Der konventionelle Bindungstest (links) gleicht dem Durchlauf einer SELEX-Runde. Beim Test auf Matrixbindung (Mitte) wurde die RNA-Lösung auf Säulen ohne immobilisiertes Azobenzol (lediglich mit Ethanolamin abreagiert) gegeben. Diese wurden auch als Vorsäulen zur Negativselektion während der SELEX verwendet. Bei den Konkurrenztests (rechts) wurde die RNA vor dem Chromatographieschritt mit dem freien Azobenzol TH-CA inkubiert. Die Ausbildung eines RNA-Ligandenkomplexes sollte dabei die Bindung der RNA an das derivatisierte Säulenmaterial unterbinden. Die einzelnen Aptamere wurden in allen Fällen radioaktiv transkribiert und vor Verwendung aufgereinigt.

Die Ergebnisse der beschriebenen Validierungsexperimente werden in Abbildung 27 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass die absoluten Prozentwerte bei den konventionell durchgeführten Bindungsstudien zu den in Abbildung 25 gezeigten abwichen. Eine Ursache dafür könnte darin gelegen haben, dass für die Experimente neue RNA transkribiert wurde. Es war festzustellen, dass die Aufreinigung der RNA (Entfernung der radioaktiven Nukleotide) unterschiedlich effizient verlief. Da die RNA-Bindung als Anteil an der insgesamt eingesetzten Radioaktivität errechnet wurde, wirkte sich eine hohe Anzahl verbleibender radioaktiver Nukleotide negativ auf diesen Wert aus. Die Reproduzierbarkeit konnte daneben durch die Instabilität der präparierten RNA beeinträchtigt werden. Zusätzlich wurden für diese Experimente neue derivatisierte Gelmatrices hergestellt. Nichtsdestotrotz wird in Abbildung 27 ersichtlich, dass die einzelnen Aptamere eine signifikant höhere Bindung an das derivatisierte als an das nicht derivatisierte Säulenmaterial zeigten. Bei den Klonen 42 und 64 wurde eine Bindung von über 30% an die Säulen mit TH-CA-Amino beobachtet, wohingegen ihre jeweilige Bindung an die mit Ethanolamin abreagierte Säule unter 5% betrug. Klon 48 zeigte eine im Vergleich zu Abbildung 25 reproduzierbare Bindung von 20% an die Azobenzolsäule und eine vierfach verringerte Bindung an die leere Säule. Der Prozentwert der Bindung verringerte sich bei Klon 34 im Vergleich zu Abbildung 25 auf etwa die Hälfte, bei Klon 45 wurde nur noch eine

sehr schwache Bindung festgestellt, weswegen er in dieser Versuchsreihe nicht weiter untersucht wurde. Die Konkurrenzexperimente mit dem freien Azobenzol TH-CA führten für alle Aptamere zu der oben beschriebenen Verringerung der RNA-Bindung an die Azobenzolsäule. Dies legte den Schluss nahe, dass alle Aptamere in der Lage waren, das freie Molekül zu binden. Bei Klon 48 war diese Verringerung der Bindung jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie etwa bei den Klonen 42 oder 64. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese RNA das immobilisierte Molekül gegenüber dem freien Molekül, welches eine Carboxylgruppe am freien Ende trägt (siehe Tab. 15), bevorzugte.

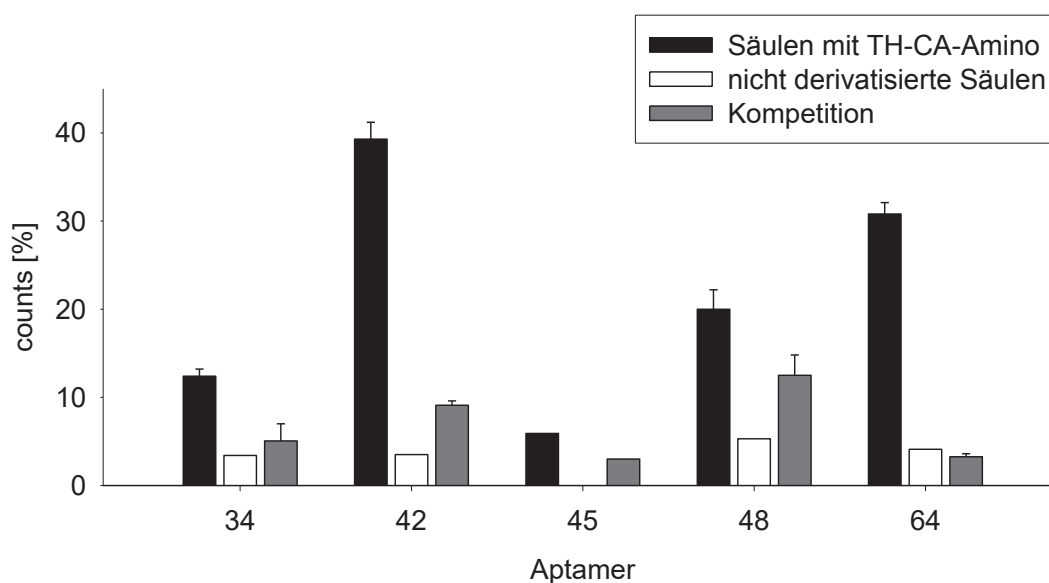


Abbildung 27: Ergebnisse der Validierungsexperimente zur Bestimmung der Bindungsspezifität der einzelnen Aptamerkandidaten. Die radioaktiv markierten Einzelklone wurden konventionellen Bindungstests (Säulen mit TH-CA-Amino), Tests zur Untersuchung der Matrixbindung (nicht derivatisierte Säulen) und Konkurrenzstudien unterzogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen. Die Messungen mit nicht derivatisierten Säulen wurden lediglich einmal durchgeführt.

4.4.6 Bindungsstudien mit Aptamerverkürzungen

Nachdem die Spezifität der Aptamere für TH-CA bzw. für das immobilisierte TH-CA-Amino nachgewiesen war, wurden Verkürzungen vorgenommen, um die zur Bindung benötigten Sequenzbereiche zu identifizieren. Bei allen Aptameren (34, 42, 48 und 64) wurden zunächst die 5'- und teilweise die 3'-konstanten Bereiche entfernt. Anhand der mit dem Programm mfold vorhergesagten Sekundärstrukturen wurden die Aptamere verkürzt und anschließend Bindungsstudien unterzogen. Die radioaktive Transkription erfolgte hierzu von hybridisierten Oligonukleotiden (34_Verkuerz_1–3, 42_Verkuerz_1, 48_Verkuerz_1–3 und 64_Verkuerz_1–3, siehe Tab. 8). Zur Gewährleistung einer effizienten Transkription durch die T7 RNA-Polymerase wurden an der Transkriptionsstartstelle ggf. 1–3 G-Nukleotide ergänzt. Dabei wurde durch

Überprüfungen mittels mfold sichergestellt, dass die Sekundärstrukturelemente erhalten blieben. Die Größe und Integrität der Transkripte wurde auf PAA-Gelen überprüft. Die Sequenzen und Sekundärstrukturen der Verkürzungen sind in Tabelle 19 und Abbildung 28 gezeigt.

Tabelle 19: Sequenzen der Aptamerverkürzungen.

Nr.	Bereich*	Sequenz (5'–3')	Länge [nt]
34_V1	nt 18–90 + 5'-GG	GGGAACUGUGCAAAAGCAAAAUUCGGCGUUC <u>CUGCU</u> <u>UCGGCAG</u> AGACGUAACACGACACAGGGGUAGAAUCCG U	75
34_V2	nt 18–46 + 5'-GG	GGGAACUGUGCAAAAGCAAAAUUCGGCGU	30
34_V3	nt 61–90 + 5'-GG	GGGACGUAACACGACACAGGGGUAGAAUCCGU	32
42_V1	nt 37–76 + 5'-G	GGUUGACCCUA <u>CUGCUUCGGCAG</u> GCCUACGGGAAAGG UAAC	41
48_V1	nt 19–91 + 5'-GGG	GGGAAUGCCGGUGUUACAUGGAAGAGCCACCC <u>CUGCUU</u> <u>CGGCAG</u> CGCACGUGAACCUAGGGACUUACGGUUCCGU AA	76
48_V2	nt 19–57 + 5'-GGG	GGGAAUGCCGGUGUUACAUGGAAGAGCCACCCUGCUU CGGCA	42
48_V3	nt 62–91 + 5'-GGG	GGGACGUGAACCUAGGGACUUACGGUUCCGUAA	33
64_V1	nt 20–89 + 5'-GGG	GGGACGUGAAUUUCCGGCGUCUAUCAGAUCCGACCCG UUCAAAUGCAUGAAAAGAAUUCGGUGUGAGUCCGU	73
64_V2	20–65 + 5'-GGG	GGGACGUGAAUUUCCGGCGUCUAUCAGAUCCGACCCG UUCAAAUGCAUG	49
64_V2	66–89 + 5'-GGG	GGGAAAAGAAUUCGGUGUGAGUCCGU	27

* Angegeben sind jeweils die Bereiche der Vollängenaptamere, welche individuell auf ihre Bindeeigenschaften untersucht wurden (inkl. der angefügten 5'-Nukleotide). Der vorgegebene Stammschleifenbereich ist fett hinterlegt und unterstrichen.

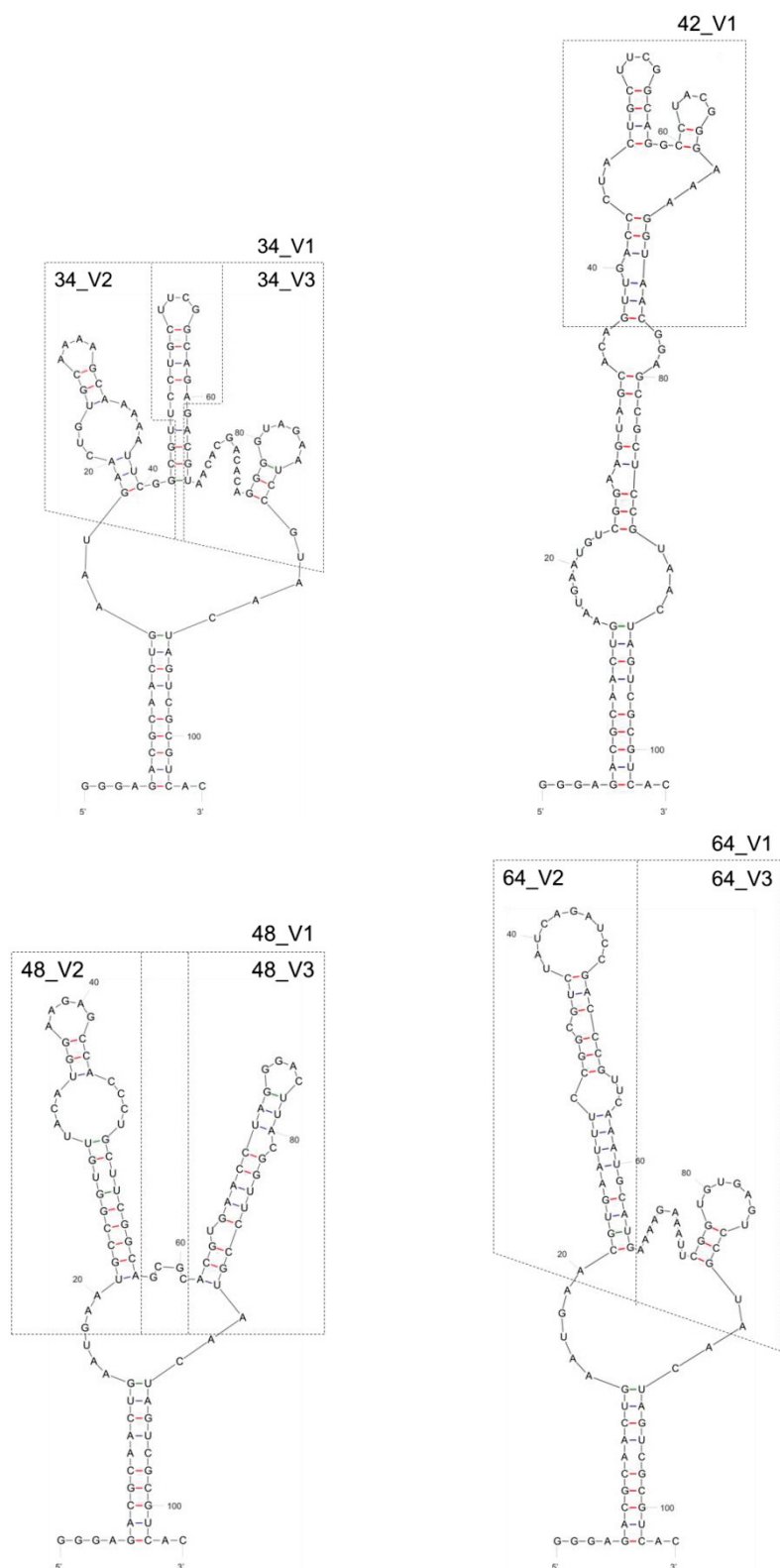


Abbildung 28: Vorhersage der Sekundärstrukturen der Aptamere 34, 42, 48 und 64 durch den Zuker-Algorithmus mittels mfold. Dargestellt sind jeweils die Strukturen mit der geringsten Minimalen Freien Energie (MFE). Die verkürzten Bereiche der Aptamere sind durch Kästen markiert. Die exakte Sequenz wird in Tabelle 19 wiedergegeben.

4.4.7 Bindungsstudien mit Aptamerverkürzungen

Die radioaktiv markierten Aptamerverkürzungen wurden konventionellen Bindungstests mit TH-CA-Amino derivatisierten Säulen unterzogen. Wie die Ergebnisse in Abbildung 29 zeigen, banden die Verkürzungen von 34, 48 und 64 nur sehr schwach im Vergleich mit ihren jeweiligen Volllängenaptameren. Die Bindung betrug in allen Fällen unter 40% des Ausgangskonstruktes. Die einzige Verkürzung, welche vergleichbare Bindeeigenschaften wie das Volllängenaptamer zeigte, war die RNA-Sequenz 42_V1. Hier konnte nach der Verkürzung eine Bindung von ~85% beibehalten werden. Diese Ergebnisse deuten an, dass die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche einen entscheidenden Einfluss auf das Bindeverhalten der meisten hier untersuchten Aptamere hatten.

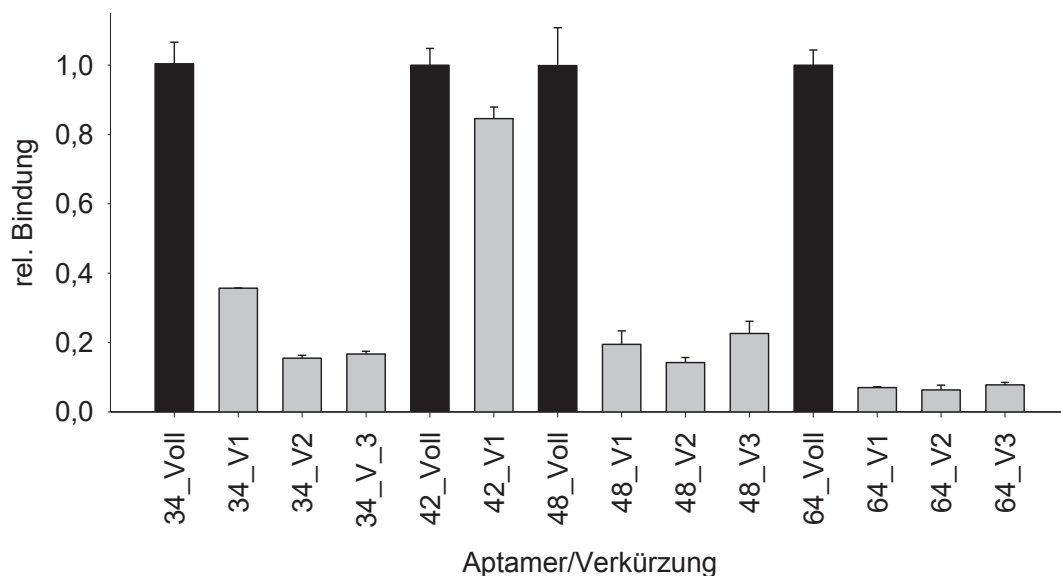


Abbildung 29: Bindungen der Volllängenaptamere 34, 42, 48 und 64 (schwarze Balken) sowie der von diesen abgeleiteten Verkürzungen (graue Balken). Es wurden konventionelle Bindungstests an mit TH-CA-Amino derivatisierten Säulen durchgeführt. Die Bindung der jeweiligen Verkürzung ist auf die absolute Bindung des entsprechenden Volllängenaptamers normiert (die entsprechenden Daten werden im Anhang in Tab. 27 gezeigt). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

Für das verkürzte Aptamer 42_V1 wurden dieselben Validierungsexperimente zur Analyse der Bindungsspezifität wie für das Volllängenaptamer 42 in Kapitel 4.4.5 durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 30 mit denen von Aptamer 42 vergleichend dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die verkürzte Sequenz das gleiche spezifische Bindeverhalten wie das Volllängenaptamer zeigte. Es kam nicht zur Bindung der Matrix. Zudem wiesen die

Kompetitionsexperimente darauf hin, dass 42_V1 das freie Zielmolekül TH-CA spezifisch erkennen konnte.

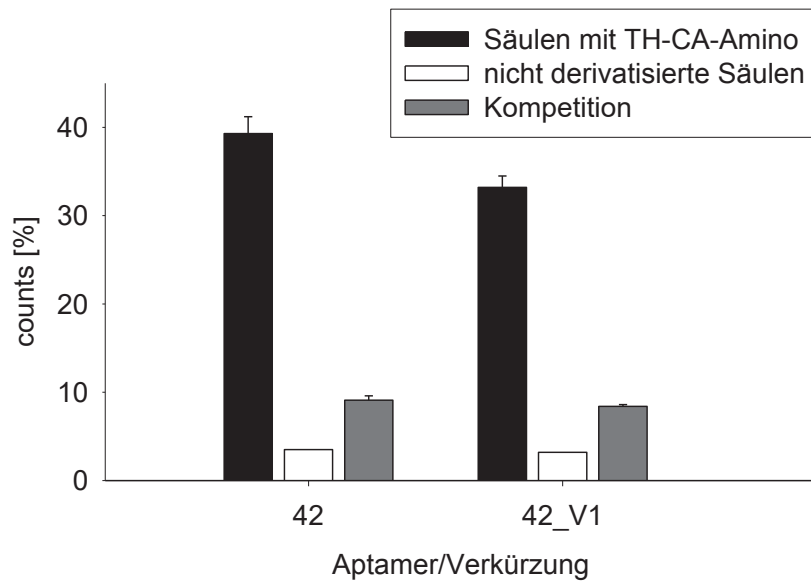


Abbildung 30: Vergleich der Ergebnisse der Validierungsexperimente zur Bestimmung der Bindungsspezifität zwischen dem Volllängentapamer 42 und der Verkürzung 42_V1. Die radioaktiv markierten RNAs wurden konventionellen Bindungstests (Säulen mit TH-CA-Amino), Tests zur Untersuchung der Matrixbindung (nicht derivatisierte Säulen) und Kompetitionstudien unterzogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen. Die Messungen mit nicht derivatisierten Säulen wurden lediglich einmal durchgeführt.

4.4.8 Bindungsstudien mit unterschiedlich belichteten Liganden

Für Aptamer 42_V1 sollte nun geprüft werden, ob die Spezifität der Bindung abhängig vom Photoisomerisierungszustand des freien Azobenzols TH-CA war. Bei allen bisherigen Elutions- und Kompetitionstests wurde die *trans*-Form von TH-CA eingesetzt, die bei Raumtemperatur und Tageslicht mehrheitlich vorliegt. Die nun durchgeführten Studien erfolgten analog zu den konventionellen Bindungstests (siehe Kapitel 4.4.5), jedoch wurden drei unterschiedliche Elutionsschemata gewählt, wie in Abbildung 31 gezeigt wird. Als Kontrolle wurde die Elution mit unbehandeltem Azobenzol durchgeführt. Dabei wurde die an das Säulenmaterial gebundene, radioaktiv markierte RNA 42_V1 durch 6 Vol. 50 μ M TH-CA_{trans} in 1x SELEX-Puffer eluiert. Für die Analyse des Elutionsvermögens des *cis*-Isomers wurde TH-CA_{trans} durch Bestrahlung mit UV_{365 nm} (1 min, 200 mA und 13,5 V; Gerät UVLED 365; Bonn) in TH-CA_{cis} überführt. In völliger Dunkelheit wurden sechs Elutionsschritte mit 50 μ M TH-CA_{cis} durchgeführt. Die UV-belichtete Azobenzollösung wurde anschließend mit Weißlicht bestrahlt (1 min, LED LENSER® - T7) und auf eine dritte Chromatographiesäule, an der sich ebenfalls die RNA 42_V1 befand, appliziert. Im Idealfall, d.h. wenn das Aptamer das *trans*-Isomer des Azobenzols deutlich gegenüber dem *cis*-Isomer bevorzugt, sollte eine Elution der RNA nur im ersten und letzten dargestellten Versuchsaufbau erfolgen, nicht jedoch durch den UV-bestrahlten Liganden. Die Konzentration des Eluenten wurde mit 50 μ M absichtlich niedriger gewählt als bei den konventionellen Elutionen mit 2,5 mM. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass durch die UV-abhängige Photoisomerisierung keine vollständige Umwandlung von TH-CA_{trans} zu TH-CA_{cis} erfolgt. Vorexperimente mit einer UV_{365 nm}-bestrahlten 2,5 mM TH-CA-Lösung zeigten, dass diese das volle Vermögen zur Elution der RNA hatte (Daten nicht gezeigt). Bei einem angenommenen Anteil an verbleibendem *trans*-Isomer von 10% würde dies bei 2,5 mM noch 250 μ M TH-CA_{trans} bedeuten. Durch eine Verringerung der Eluentenkonzentration konnte die nicht isomerisierte Form gering gehalten werden, wodurch diese das Ergebnis nicht verfälschte.

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der Elutionstests dargestellt. Das Elutionsvermögen des unbestrahlten Azobenzols TH-CA, von welchem ein nahezu vollständiger *trans*-Isomerisierungsgrad angenommen wurde, diente als Referenz. Eluierte man die RNA 42_V1 nun mit einer UV_{365 nm}-bestrahlten TH-CA-Lösung derselben Konzentration, erhielt man nur 40% des Referenzwertes. Wurde dieselbe, zuvor mit UV-Licht behandelte Azobenzollösung nun wieder mit Weißlicht bestrahlt, wurde das Elutionsvermögen zu 95% wiederhergestellt. Es wird somit deutlich, dass die RNA 42_V1 nur von TH-CA_{trans} eluiert werden konnte, was eine Photoisomer-spezifische Bindung unterstreicht. Das Elutionsvermögen durch TH-CA_{cis} war vergleichbar mit dessen von 1x SELEX-Puffer ohne Azobenzol (Waschschritte).

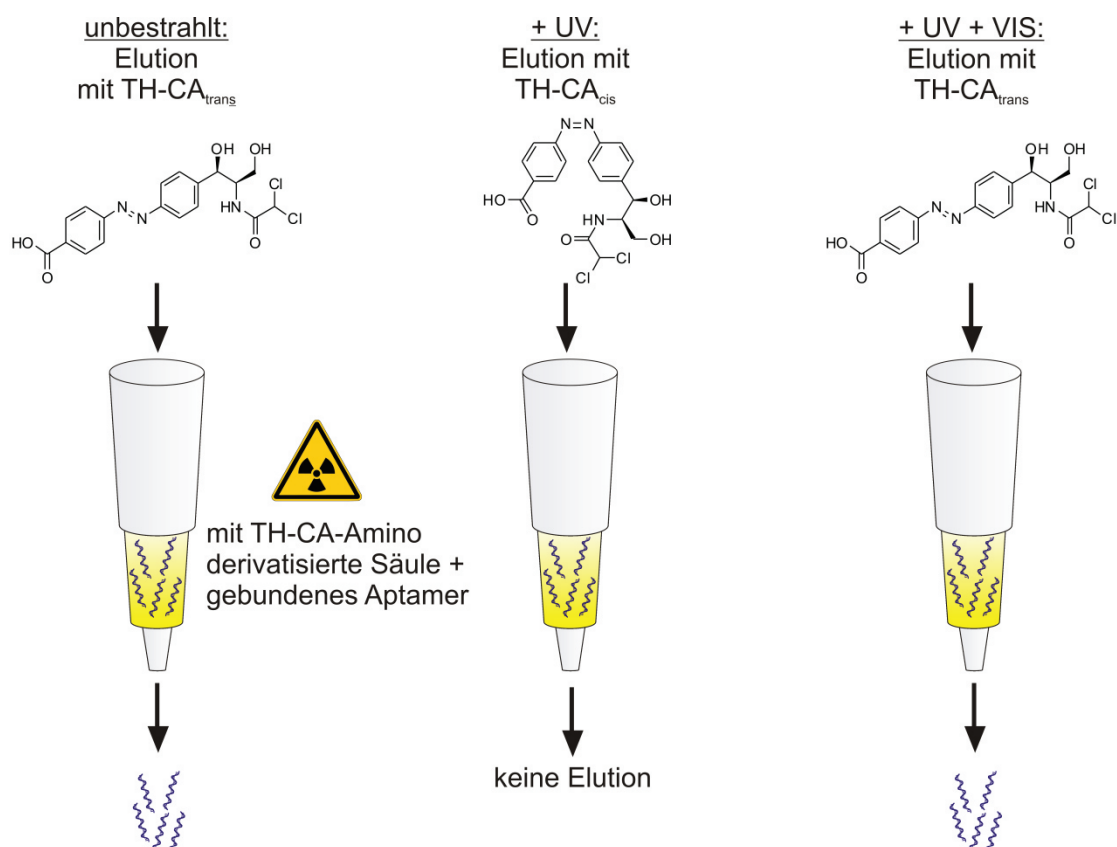


Abbildung 31: Durchführung zur Analyse des Elutionsvermögens der TH-CA-Photoisomere. Die radioaktiv markierte RNA wurde auf azobenzolderivatisierte Säulen appliziert, 30 min inkubiert und schließlich fünf Waschschritten unterzogen. Die bindenden RNA-Moleküle wurden unterschiedlich eluiert. Links: Elution mit dem unbestrahlten freien Azobenzol TH-CA, welches mehrheitlich in *trans* vorlag. Mitte: Elution mit UV_{365 nm}-bestrahltem TH-CA, welches mehrheitlich in *cis* vorlag. Rechts: Die *cis*-Form wurde durch Weißlicht wieder in *trans* überführt und zur Elution eingesetzt. Erkennt die RNA tatsächlich nur das *trans*-Isomer, so findet eine Elution nur im ersten und im letztgenannten Fall statt. Als Kontrolle erfolgte die Elution mit 1x SELEX-Puffer ohne Azobenzol (nicht dargestellt).

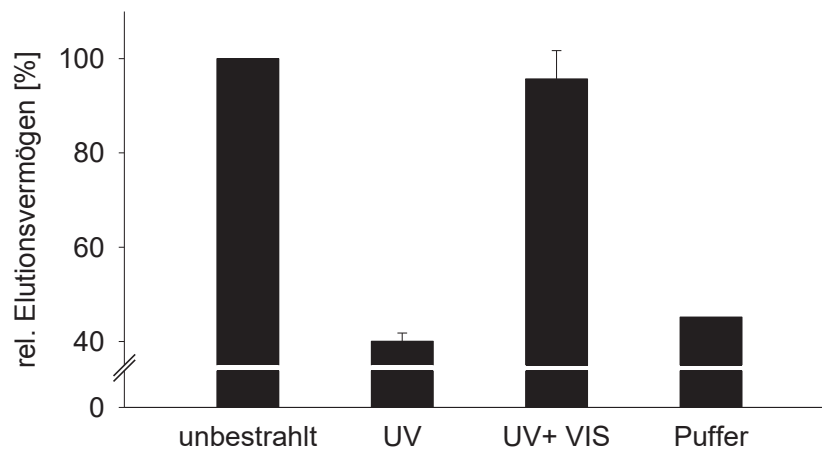


Abbildung 32: Analyse des Elutionsvermögens der RNA 42_V1 durch unterschiedlich belichtete TH-CA-Lösungen. Die RNA 42_V1 wurde radioaktiv markiert und nach dem Faltungsprogramm (Gesamtvolumen 500 μ l, in 1x SELEX-Puffer + 0,3 μ g/ μ l Hefe-tRNA) auf die azobenzolderivatisierten Säulen appliziert. Nach einer Inkubation für 30 min bei RT folgten fünf Waschschrte mit je 1 ml 1x SELEX-Puffer. Die bindenden RNA-Moleküle wurden mit unterschiedlich bestrahltem Liganden TH-CA bzw. mit 1x-SELEX-Puffer eluiert (wie in Abb. 31 dargestellt). Das Elutionsvermögen von unbestrahltem TH-CA_{trans} diente als Referenz (die Rohdaten sind im Anhang in Tab. 28 gezeigt). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

4.4.9 Isotherme Titrationskalorimetrie

Für die Aptamere 42, 42_V1 und 64 sollte die Bindungsaffinität zu den Azobenzolderivaten durch ITC bestimmt werden. Die Durchführung der Methode wurde bereits für die Aptamerkandidaten aus der Dynabeads®-SELEX in Kapitel 4.3.6 beschrieben. Die entsprechenden Sequenzen wurden in pWHE200 kloniert. Die mit HindIII linearisierten Plasmide wurden folgend zur *run off*-Transkription in großem Maßstab eingesetzt (siehe Kapitel 3.6.14). Zur Messung wurden die RNA-Aptamere dem in der SELEX angewandten Faltungsprogramm unterzogen (5 min 95°C, 5 min Eis, Zugabe von 1x SELEX-Puffer und Inkubation für 15 min bei RT). Es wurde keine Hefe-tRNA hinzugegeben. Die DMSO-Konzentrationen wurden in der RNA- und Titrantenlösung exakt gleich eingestellt, um unspezifischen Verdünnungseffekten vorzubeugen. Die Messzelle wurde mit 0,2 ml 20 μ M RNA-Lösung befüllt. Die Spritze enthielt den Liganden (200–300 μ M der jeweiligen Azobenzole TH-CA oder TH-CA-Amino bzw. Chloramphenicol als Kontrolle). Die Messungen erfolgten bei 25°C. Nach einer Präequilibrierung und einem initialen Verzug von 180 s erfolgte eine erste Injektion von 0,2 μ l, gefolgt von 15 Injektionen von je 2,5 μ l im zeitlichen Abstand von je 180 s. Die Geschwindigkeit des Rührers der Probeninjektionsspritze wurde auf 1000 rpm festgesetzt. Die Referenzleistung betrug 6 μ cal/s. Die Rohdaten wurden mithilfe der Origin 7.0 Software ausgewertet. Durch Integration der gemessenen Ausschläge wurde die freigesetzte Wärmemenge erhalten, die gegen das steigende molare Verhältnis von Ligand zu RNA aufgetragen wurde. Durch Anpassen einer sigmoidalen theoretischen Kurve an diese Daten wurden die Werte für ΔH , ΔS und die Bindungskonstante K_d erhalten. Zur Korrektur von Verdünnungseffekten wurden ITC-Messungen durchgeführt, bei welchen der jeweilige Ligand in 1x SELEX-Puffer (ohne RNA) titriert wurde (Daten nicht gezeigt). Zur Untersuchung Photoisomer-abhängiger Bindereaktionen wurde die Azobenzol-Titrantenlösung unmittelbar vor der Befüllung der Probeninjektionsspritze mit UV_{365 nm} bestrahlt (1 min, 200 mA und 13,5 V; Gerät UVLED 365; Bonn). Die Messungen wurden dann in vollständiger Dunkelheit durchgeführt, damit der Titrant in der gläsernen Probeninjektionsspritze nicht durch die Umgebungsbeleuchtung wieder in die *trans*-Form isomerisieren konnte.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 33 bis Abbildung 36 dargestellt sowie in Tabelle 20 zusammengefasst. Jede Messung wurde zweimal durchgeführt, wobei in dieser Arbeit jeweils nur eine Titration abgebildet wird. Für alle Aptamere konnte eine Interaktion mit den *trans*-Photoisomeren der Azobenzole TH-CA und TH-CA-Amino nachgewiesen werden. Die K_d -Werte lagen dabei im mikromolaren Bereich. Der niedrigste K_d -Werte und somit die stärkste Interaktion konnte zwischen dem verkürzten Aptamer 42_V1 und TH-CA-Amino beobachtet werden (0,8 μ M). Das zugehörige Volllängenaptamer 42 zeigte eine vergleichbare Bindung mit $K_d = 1,2 \mu$ M zu TH-CA-Amino. Beide Aptamere wiesen schwächere Interaktionen mit TH-CA auf mit K_d -Werten von 3,6 μ M für Aptamer 42_V1 und 1,9 μ M für Aptamer 42. Eine vorausgegangene Bestrahlung der titrierten Aptamerlösungen (sowohl TH-CA als auch TH-CA-Amino) mit UV_{365 nm} führte für beide Aptamere zu einer signifikanten Verringerung der jeweiligen

Interaktion, sodass eine Bestimmung der Bindekonstanten nicht mehr möglich war. Dieses Ergebnis führt zur Annahme, dass die Aptamere 42 und 42_V1 in der Tat zwischen den Photoisomeren diskriminieren können. Zudem zeigten Kontrolltitrationen mit dem strukturell ähnlichen Chloramphenicol, dass beide Aptamere nur spezifisch die Azobenzolderivate erkennen können (siehe Abb. 35). Das Aptamer 64 wurde lediglich hinsichtlich der Interaktion mit TH-CA getestet. Die Dissoziationskonstante lag hier vergleichbar zu den Aptameren 42 und 42_V1 im niederen mikromolaren Bereich ($K_d = 1,4 \mu\text{M}$). Die ITC-Messungen mit der TH-CA_{cis}-Lösung zeigten für Aptamer 64 keinen vollständigen Verlust der Aptamer-Ligandeninteraktion wie bei 42 und 42_V1. Der K_d -Wert stieg hierbei auf $2,8 \mu\text{M}$. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die mit der Isomerisierung einhergehenden strukturellen Änderungen des Azobenzols die Erkennung durch Aptamer 64 nur teilweise einschränkten.

In Abbildung 37 werden die Enthalpie- und Entropieänderungen für diejenigen Aptamer-Ligandenkomplexe dargestellt, denen eine starke Interaktion nachgewiesen werden konnte. Die Änderung der freien Energie ΔG berechnete sich dabei aus der Differenz der freien Enthalpie ΔH und der Entropieänderung $T\Delta S$, wobei T die Temperatur in Kelvin ist (in den dargestellten Fällen $298,15 \text{ Kelvin} = 25^\circ\text{C}$). Es zeigte sich, dass die Änderung der freien Energie ΔG für alle Komplexe einen nahezu identischen Wert von -8 kcal/mol einnahm, wobei sich die einzelnen enthalpischen und entropischen Beiträge jedoch stark unterschieden. Die größte Enthalpieabnahme ging dabei bei der Bindung zwischen dem Aptamer 64 und TH-CA_{trans} vorstatten. Diese wurde jedoch durch die ungünstige Entropieabnahme wieder kompensiert (sog. Enthalpie/Entropiekompensation). Die Titration von Aptamer 64 mit der UV-bestrahlten TH-CA_{cis}-Lösung zeichnete sich durch eine geringere Enthalpieabnahme aus. Da aber gleichzeitig ein günstigerer Entropiebeitrag gemessen wurde, blieb ΔG im Vergleich zur Titration mit TH-CA_{trans} nahezu gleich. Für die Aptamere 42 und 42_V1 wurden für die Interaktionen mit TH-CA und TH-CA-Amino günstige Enthalpiebeiträge gemessen, die teilweise von der ungünstigen entropischen Abnahme kompensiert wurden.

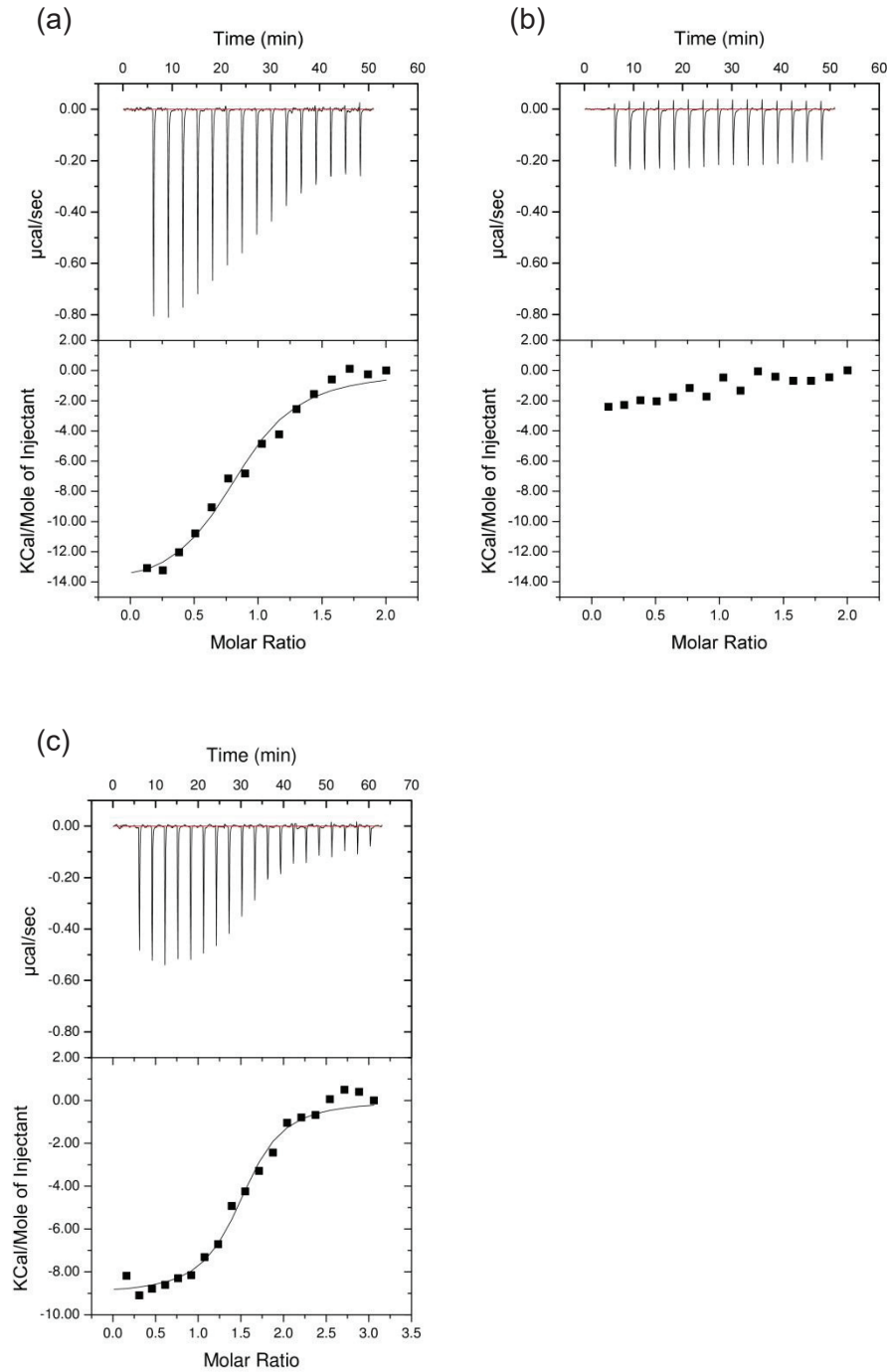


Abbildung 33: Ergebnisse der isothermen kalorimetrischen Titration des Aptamers 42 (20 μM) mit (a) 200 μM TH-CA_{trans}, (b) 200 μM TH-CA_{cis} und (c) 300 μM TH-CA-Amino_{trans}. Die oberen Graphen zeigen die Rohdaten der Titration. Die unteren Graphen zeigen die durch Integration der Peaks erhaltenen Wärmeumsätze in kcal/mol pro Injektion, aufgetragen gegen das molare Verhältnis aus Ligand/RNA. Die durchgezogene Linie zeigt die an die Messpunkte angepasste Kurve nach dem einseitigen Bindemodell (*one-site binding model*, Origin 7.0 ITC Software).

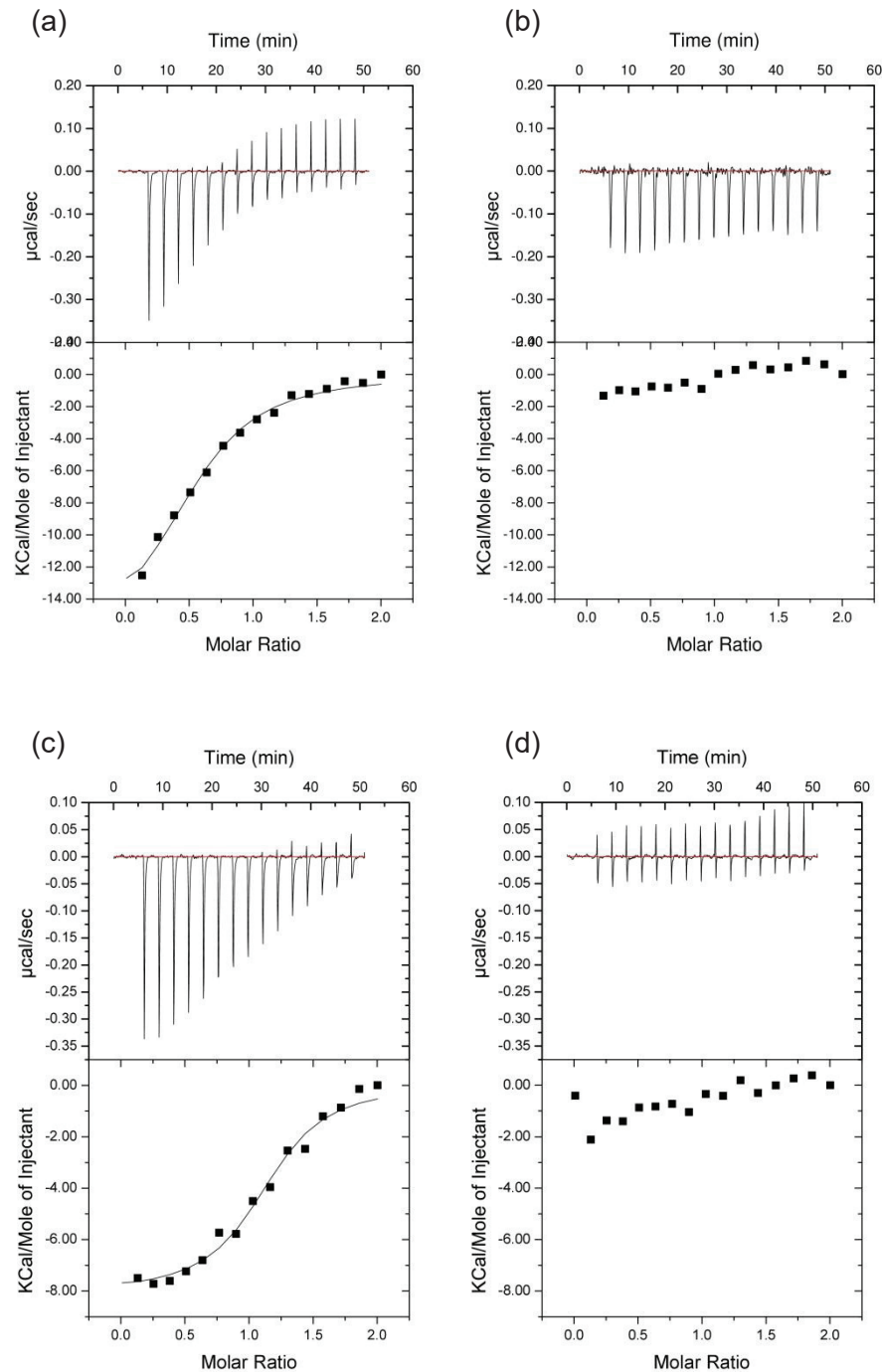


Abbildung 34: Ergebnisse der isothermen kalorimetrischen Titration des Aptamers 42_V1 (20 μM) mit (a) 200 μM TH-CA_{trans}, (b) 200 μM TH-CA_{cis}, (c) 200 μM TH-CA-Amino_{trans} und (d) 200 μM TH-CA-Amino_{cis}. Die oberen Graphen zeigen die Rohdaten der Titration. Die unteren Graphen zeigen die durch Integration der Peaks erhaltenen Wärmeumsätze in kcal/mol pro Injektion, aufgetragen gegen das molare Verhältnis aus Ligand/RNA. Die durchgezogene Linie zeigt die an die Messpunkte angepasste Kurve nach dem einseitigen Bindemodell (*one-site binding model*, Origin 7.0 ITC Software).

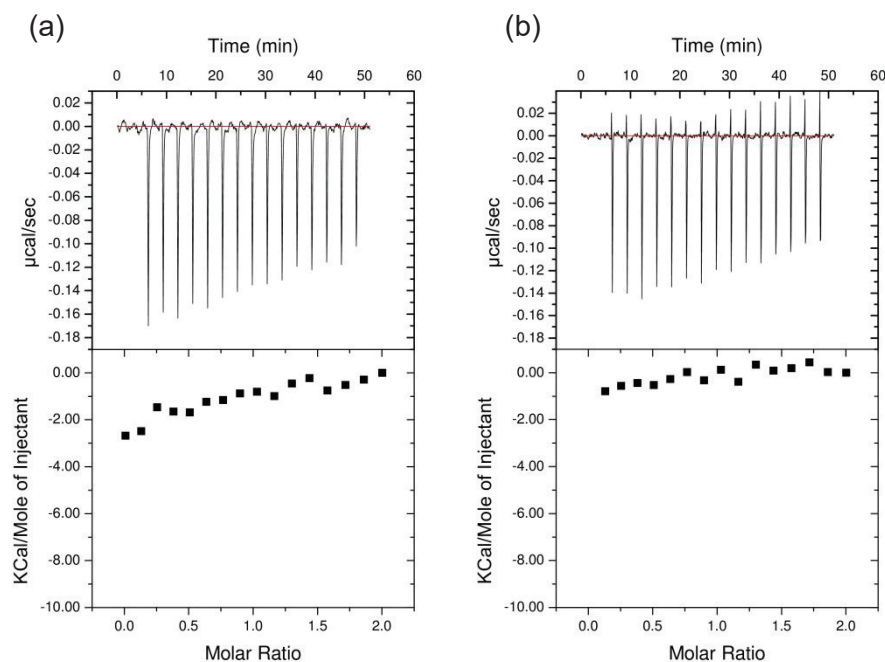


Abbildung 35: Ergebnisse der isothermen kalorimetrischen Titration (a) des Aptamers 42 (20 μM) mit 200 μM Chloramphenicol und (b) des Aptamers 42_V1 (20 μM) mit 200 μM Chloramphenicol. Die oberen Graphen zeigen die Rohdaten der Titration. Die unteren Graphen zeigen die durch Integration der Peaks erhaltenen Wärmeumsätze in kcal/mol pro Injektion, aufgetragen gegen das molare Verhältnis aus Ligand/RNA.

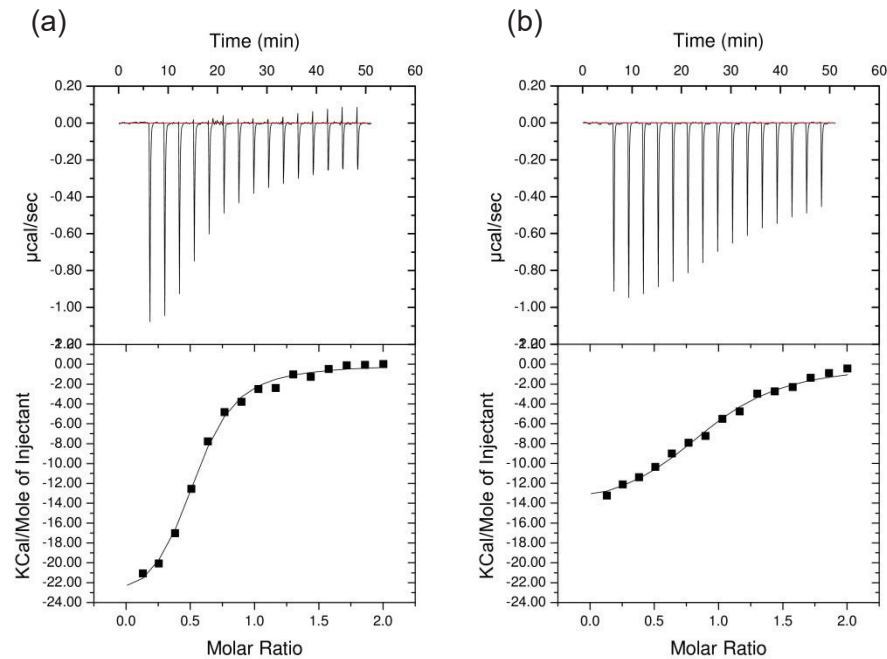


Abbildung 36: Ergebnisse der isothermen kalorimetrischen Titration des Aptamers 64 (20 μM) mit (a) 200 μM TH-CA_{trans} und (b) 200 μM TH-CA_{cis}. Die oberen Graphen zeigen die Rohdaten der Titration. Die unteren Graphen zeigen die durch Integration der Peaks erhaltenen Wärmeumsätze in kcal/mol pro Injektion, aufgetragen gegen das molare Verhältnis aus Ligand/RNA. Die durchgezogene Linie zeigt die an die Messpunkte angepasste Kurve nach dem einseitigen Bindemodell (*one-site binding model*, Origin 7.0 ITC Software).

Tabelle 20: Dissoziationskonstanten K_d , freie Energie ΔG , Enthalpie ΔH und Entropie $-T\Delta S$ der Interaktionen zwischen den Aptameren 42, 42_V1 und 64 mit den entsprechenden Photoisomeren von TH-CA oder TH-CA-Amino bzw. mit Chloramphenicol.

Aptamer	Ligand	K_d [μM]	ΔG [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]
42	TH-CA _{trans}	$1,9 \pm 0,3$	$-7,8 \pm 0,1$	$-16,8 \pm 2,1$	$9,0 \pm 2,2$
42	TH-CA _{cis}	nicht bestimmbar			
42	TH-CA-Amino _{trans}	$1,2 \pm 0,4$	$-8,1 \pm 0,2$	$-10,8 \pm 1,7$	$2,6 \pm 1,9$
42	Chloramphenicol	nicht bestimmbar			
42_V1	TH-CA _{trans}	$3,6 \pm 0,1$	$-7,4 \pm 0,0$	$-15,8 \pm 1,0$	$8,4 \pm 1,0$
42_V1	TH-CA _{cis}	nicht bestimmbar			
42_V1	TH-CA-Amino _{trans}	$0,8 \pm 0,2$	$-8,3 \pm 0,1$	$-7,6 \pm 0,4$	$-0,7 \pm 0,5$
42_V1	TH-CA-Amino _{cis}	nicht bestimmbar			
42_V1	Chloramphenicol	nicht bestimmbar			
64	TH-CA _{trans}	$1,4 \pm 0,4$	$-8,0 \pm 0,2$	$-24,4 \pm 0,8$	$16,4 \pm 1$
64	TH-CA _{cis}	$2,8 \pm 0,6$	$-7,6 \pm 0,1$	$-9,6 \pm 4,4$	$2,0 \pm 4,2$

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen. $T = 298,15$ Kelvin (25°C).

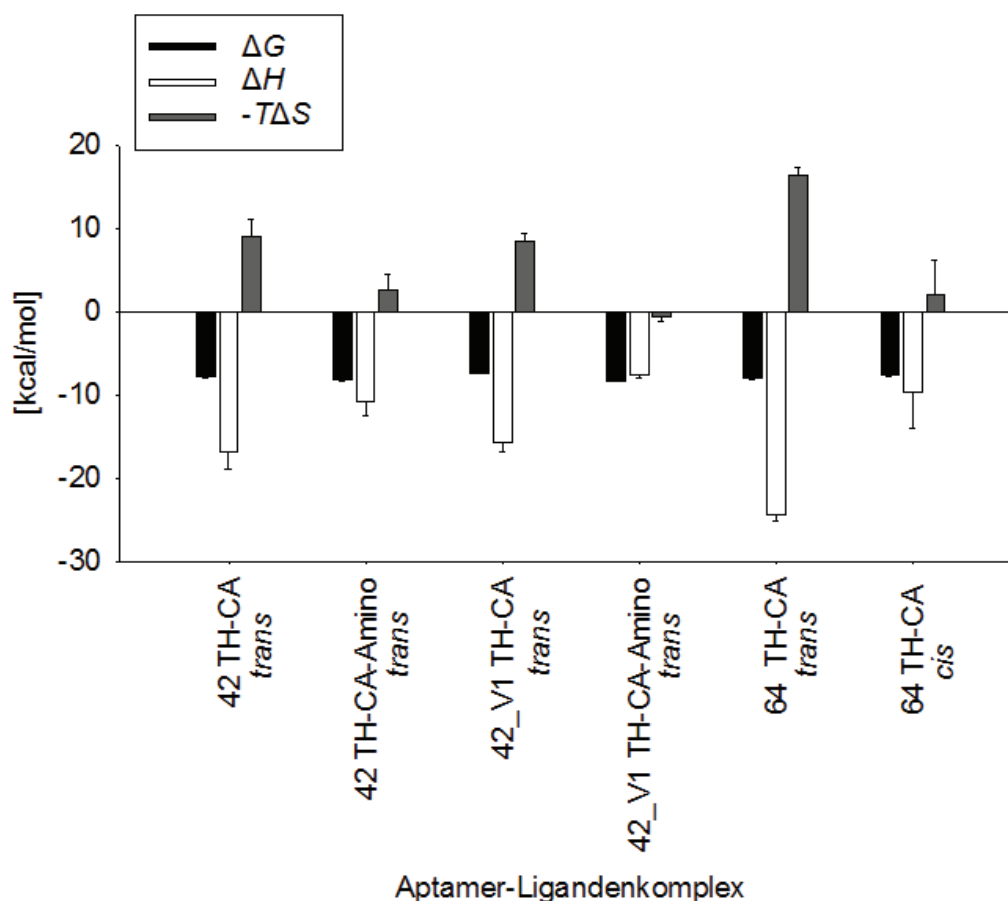


Abbildung 37: Darstellung der enthalpischen und entropischen Beiträge zur Bindung der Aptamere 42, 42_V1 und 64 mit TH-CA_{trans/cis} oder TH-CA-Amino_{trans} (Werte in Tab. 20). $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, wobei $T = 298,15$ Kelvin (25°C). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

4.5 Verwendung azobenzolbindender Aptamere zur Konstruktion synthetischer Riboswitche in *S. cerevisiae*

Mit den im SELEX-Verfahren identifizierten Aptameren sollten azobenzolabhängige Riboswitche in *S. cerevisiae* konstruiert werden, welche ein belichtungsabhängiges Regulationsverhalten zeigen. Als Testsystem wurde hierfür das GFP-Reportergenplasmid pWHE601 verwendet, welches bereits zur Konstruktion tetrazyklinabhängiger Riboswitche diente (Suess, *et al.*, 2003). Es handelt sich um ein 2 μ -Plasmid, welches das *URA3*-Gen als Auxotrophiemarker für *S. cerevisiae* und das Ampicillinresistenzgen *bla* zur Selektion in *E. coli* trägt. Das *gfp*⁺-Gen (Scholz, *et al.*, 2000) wird konstitutiv durch den Alkoholdehydrogenasepromotor *adh1* exprimiert. Als erster Schritt wurde der Einfluss der Azobenzolderivate auf die Reportergenexpression eruiert (Kapitel 4.5.1). Anschließend wurden die Aptamere in den 5'-UTR vor dem *gfp*⁺-Gen integriert und hinsichtlich einer Riboswitchaktivität getestet (Kapitel 4.5.2).

4.5.1 Eignung des Systems

Es wurde zunächst geprüft, welchen Einfluss die Azobenzolderivate TH-CA und TH-CA-Amino auf die GFP-vermittelte Fluoreszenz von Hefezellen ausübten. Hierzu wurde ein Konzentrationsbereich von 0–250 μM in SCD-URA-Medium (+ 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 zur verbesserten Löslichkeit der Azobenzole) gewählt. Die Durchführung der GFP-Messung wird in Kapitel 3.8.2 beschrieben. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 38 gezeigt. Während TH-CA ab einer Konzentration von 100 μM zu einer sichtbaren Abnahme der Fluoreszenz (normiert auf die Zelldichte) führte, zeigte TH-CA-Amino eine Zunahme dieser. Die dargestellten Ergebnisse lassen einen großen Interpretationsspielraum zu. Es kann keine Aussage getroffen werden, ob die Azobenzolderivate in die Zellen aufgenommen wurden oder toxisch wirken. Nichtsdestotrotz wurde sich dafür entschieden, alle folgenden Experimente mit einer Konzentration von 100 μM durchzuführen.

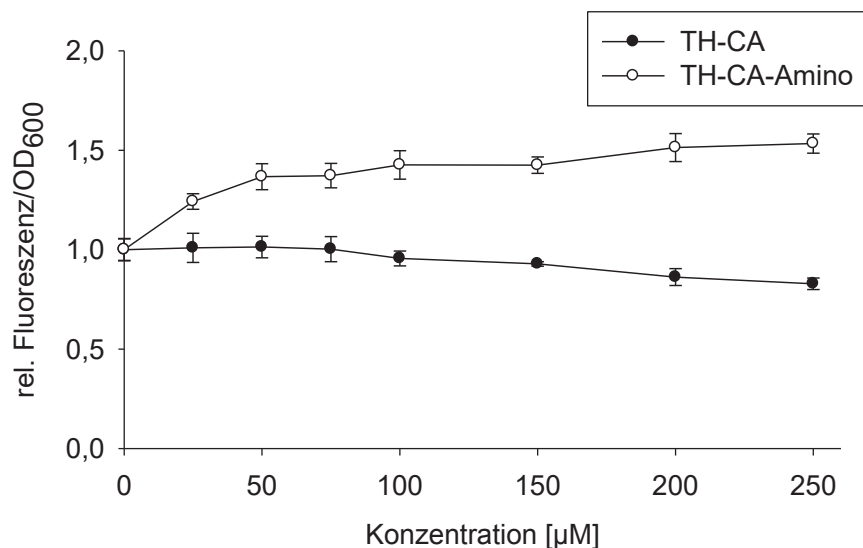


Abbildung 38: Einfluss verschiedener Konzentrationen von TH-CA und TH-CA-Amino auf die Fluoreszenz von Kulturen von *S. cerevisiae* RS453 pWHE601. Die Anzucht erfolgte in SCD-URA-Flüssigmedium (+ 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) statisch in Mikrotiterplatten (96-Well, U-Bottom) für 48 h bei 28°C. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten im Tecan Mikroplatten-Reader. Die Messwerte sind jeweils auf die Referenzmessungen in Abwesenheit von TH-CA bzw. TH-CA-Amino normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

4.5.2 Konstruktion der Riboswitch-Reportergenplasmide

Zur Konstruktion der Riboswitch wurden die entsprechenden Aptamere in den 5'-UTR des *gfp+*-Gens kloniert. Der ursprüngliche 5'-UTR von pWHE601 enthält Restriktionsschnittstellen für AflIII und NheI. Erstere wurde durch AgeI ersetzt, da dieses eine bessere Ligationseffizienz zeigt. Das Plasmid wurde folgend pWHE601-AgeI benannt und ist in Abbildung 39 dargestellt.

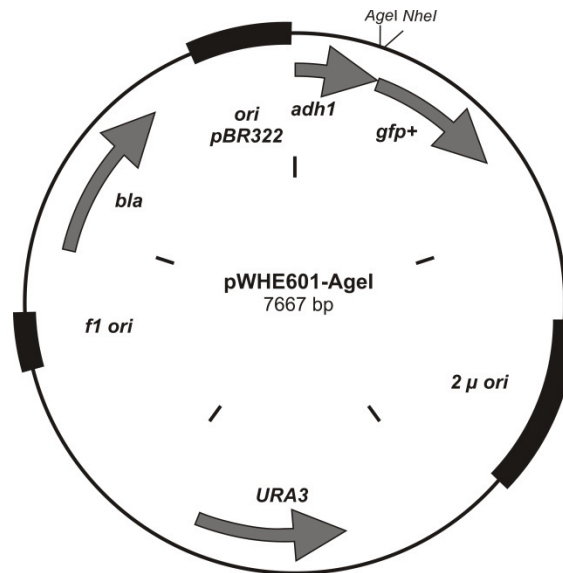


Abbildung 39: Reportergenplasmid pWHE601-AgeI. *adh1* = Alkoholdehydrogenasepromotor. *gfp+* = Variante des grünfluoreszierenden Proteins. *2 μ ori* = Replikationsursprung in *S. cerevisiae*. *URA3* = Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylasegen, Auxotrophie-Selektionsmarker. *f1 ori* = Replikationsursprung des Phagen f1. *bla* = Ampicillinresistenzgen. *ori pBR322* = Replikationsursprung in *E. coli*. Die Klonierung der Aptamersequenzen erfolgte in den 5'-UTR des *gfp+*-Gens über die angezeigten AgeI- und NheI-Restriktionsschnittstellen.

Aptamer 64 wurde nicht zur Konstruktion der Riboswitch gewählt, da es zum einen nicht verkürzt werden konnte und weil es zum anderen zwei im Aptamer lokalisierte, dicht aufeinanderfolgende AUG-Triplets besitzt, die zu einem vorzeitigen Translationsstart führen würden (vgl. Abb. 28; Nukleotide 59–65). Diese hätten zuvor mutagenisiert werden müssen, was einen Verlust der Bindung der Azobenzolderivate zur Folge hätte haben können. Zur Konstruktion der Riboswitch wurden verkürzte Varianten des Aptamers 42 verwendet. Diese wurden aus den Oligonukleotiden MMR42V1+/-, MMR42V2+/-, DbIA+/- mit DbIB+/- und loopF/R (Tab. 9) hybridisiert und durch passgenaue Nukleotidüberhänge in die AgeI- und NheI-Schnittstellen von pWHE601-AgeI kloniert. Die resultierenden Plasmide erhielten die Nomenklatur pWHEMMR-42V1/-42V2/-42DbI/-42loop. Die 5'-UTRs sind in Abbildung 40 gezeigt. Nach Überprüfung der korrekten Aptamerinsertionen durch Sequenzierungen mit dem Oligonukleotid pWHE601-seq wurden die Plasmide in *S. cerevisiae* RS453 transformiert (zur Durchführung siehe 3.7.2.3).

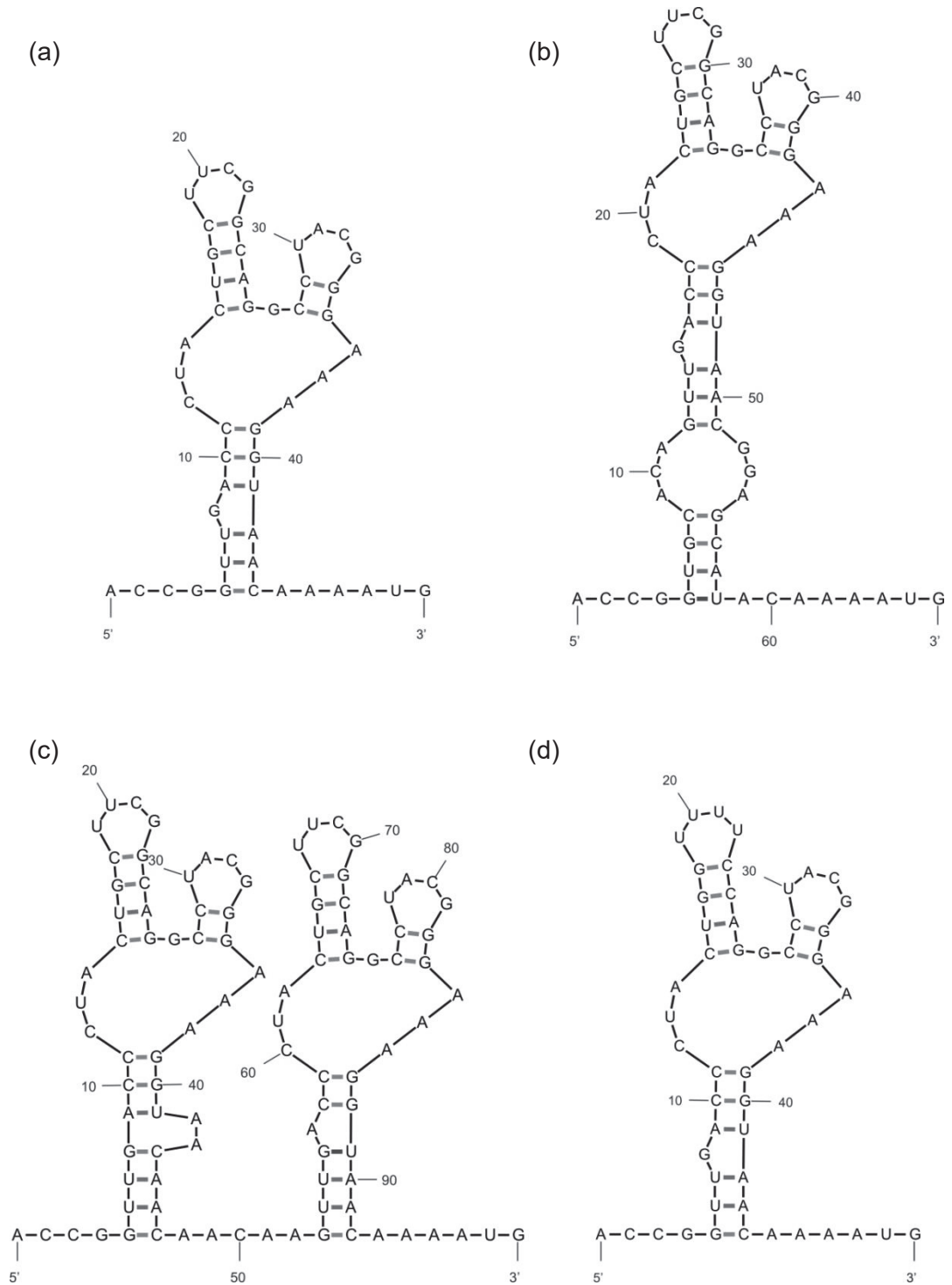


Abbildung 40: Vorhersage der Sekundärstrukturen der 5'-UTRs (jeweils des *gfp*⁺-Gens) in den entsprechenden Riboswitch-Reportergenplasmiden (a) pWHEMMR-42V1, (b) pWHEMMR-42V2, (c) pWHEMMR-42DbI und (d) pWHEMMR-42loop. Dargestellt sind jeweils die Strukturen mit der geringsten Minimalen Freien Energie (MFE). Die Sequenzen beginnen mit der transkribierten Agel-Schnittstelle 5'-ACCGGU-3' und enden mit dem Startcodon AUG des *gfp*⁺-Reportergens.

Wie in Abbildung 40 gezeigt wird, wurden die Aptamere jeweils proximal zum Startcodon AUG integriert. Zur Konstruktion von pWHEMMR-42V1 wurde dabei das Aptamer 42_V1 verwendet (siehe Abb. 28 und Tab. 19). In pWHEMMR-42DbI wurden zwei dieser Aptamere hintereinander gesetzt und durch einen CAACAA-Spacer getrennt. Bei pWHEMMR-42V2 wurde ein längerer Stammbereich verglichen mit 42V1 verwendet. Das Konstrukt pWHEMMR42loop unterscheidet sich von pWHEMMR42V1 nur dadurch, dass der stabile Tetraloop im Bereich der Nukleotide 18–23 destabilisiert wurde. Hierzu wurde 5'-CUUCGG-3' zu 5'GUUUUC-3' mutagenisiert (siehe Diskussion in Kapitel 5.1.6).

Die mit diesen Plasmiden transformierten Hefestämme wurden Fluoreszenzmessungen unterzogen, wie sie im vorhergehenden Kapitel beschrieben sind. Dabei erfolgte die Kultivierung in Mikrotiterplatten, wobei die Vorkulturen in SCD-URA-Medium ohne und mit 100 µM TH-CA bzw. TH-CA-Amino aufgeteilt wurden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 41 dargestellt. Alle Daten sind auf die Messwerte des konstitutiv GFP-exprimierenden Referenzstammes *S. cerevisiae* RS453 pWHE601 (Kultivierung ohne Azobenzol) normiert. Es ist ersichtlich, dass die Integration der Riboswitche für die Konstrukte pWHEMMR-42V1/-V2/-42DbI zu einer erheblichen Reduktion der GFP-Expression und somit der Fluoreszenz führten (<3% des Referenzstammes). Ein Einfluss der Azobenzolderivate war dagegen nicht detektierbar. Das Konstrukt pWHEMMR-42loop zeigte eine höhere GFP-Expression (ca. 14% des Referenzstammes). Dennoch war auch hier keine Reduktion der Fluoreszenz durch ein Azobenzolderivat messbar.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Integrationen der Aptamerverkürzungen von Kandidat 42 in die 5'-untranslatierten Bereiche die Genexpression des *gfp+*-Gens nahezu vollständig inhibierten und somit keine Aussage über eine Regulation durch TH-CA oder TH-CA-Amino getroffen werden konnte. Eine Destabilisierung der Sekundärstruktur ließ das Expressionsniveau zwar ansteigen, aber ein ligandenabhängiger Effekt konnte nicht beobachtet werden. Die Konstruktion azobenzolabhängiger Riboswitche in *S. cerevisiae* war somit nicht zielführend.

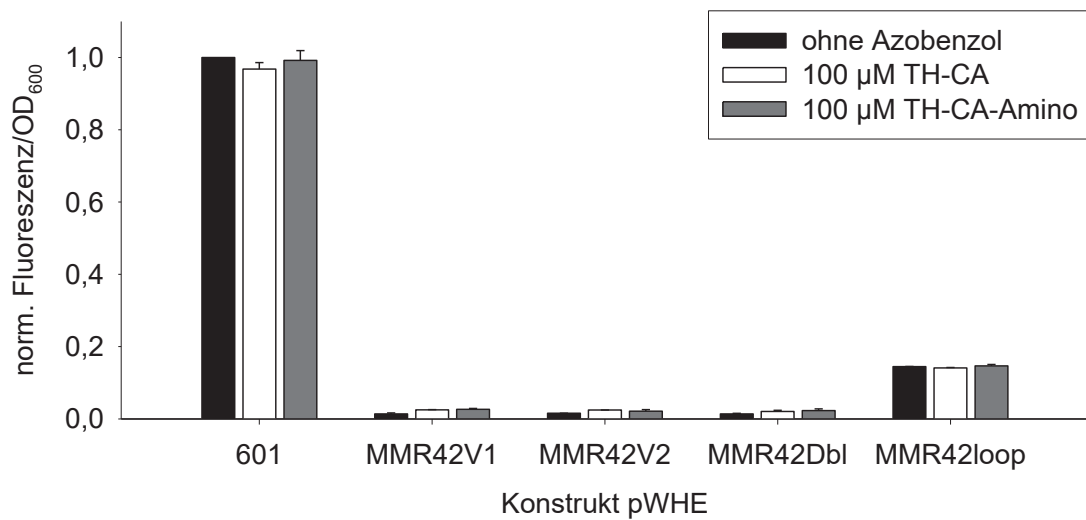


Abbildung 41: Messung der Fluoreszenz von Kulturen von *S. cerevisiae* RS453, transformiert mit pWHE601, pWHEMMR-42V1, pWHEMMR-42V2, pWHEMMR-42Dbl oder pWHEMMR-42loop. Die Anzucht erfolgte in SCD-URA-Flüssigmedium (+ 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) statisch in Mikrotiterplatten (96-Well, U-Bottom) für 48 h bei 28°C. Die Vorkulturen wurden dazu in Medium ohne und mit 100 µM TH-CA bzw. TH-CA-Amino aufgeteilt. Alle Daten sind auf die Messwerte des Referenzstammes *S. cerevisiae* RS453 pWHE601 (Kultivierung ohne Azobenzol) normiert (die Rohdaten sind im Anhang in Tab. 29 gezeigt). Die Fluoreszenzmessungen erfolgten im Tecan Mikroplatten-Reader. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

4.6 Konstruktion riboswitchkontrollierter Expressionssysteme in *Streptomyces coelicolor*

Durch Justin P. Gallivan und seine Mitarbeiter wurden sechs theophyllinabhängige Riboswitche zur Regulation der prokaryotischen Translationsinitiation entwickelt (beschrieben in Kapitel 2.4.2.2). Diese Riboswitche (A–E*) wurden im zweiten Teil dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Eignung zur konditionalen Genexpression im Gram-positiven Bakterium *S. coelicolor* untersucht. Zu qualitativen und quantitativen Studien über die Regulationsfähigkeit der Riboswitche wurde sich eines speziell an den Codongebrauch von Actinomyceten angepassten β -Glucuronidasereportersystems bedient (Myronovskyi, *et al.*, 2011). Im Folgenden wird die Konstruktion und Anwendung des Testsystems beschrieben.

4.6.1 Konstruktion und Integration der *gusA*-Reporterergenplasmide

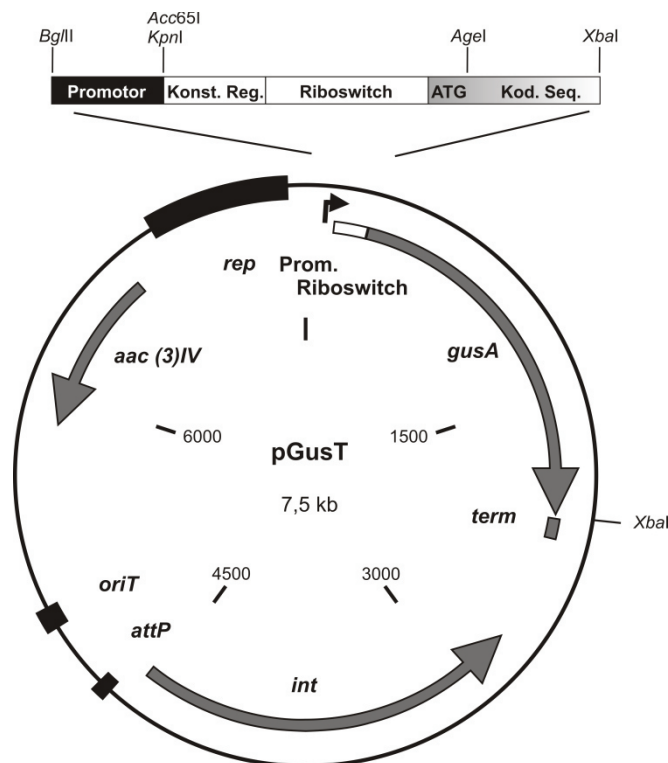


Abbildung 42: Darstellung des integrativen *gusA*-Reporterergenplasmids. Prom = Promotor; *gusA* = β -Glucuronidasegen; term = synthetischer Terminator; *int* und *attP* = Integrasesen und Anhaftungsstelle (*attachment site*) des Phagen phiC31; *oriT* = Transferursprung (*origin of transfer*); *acc (3)IV* = Apramycinresistenzgen; *rep* = Replikationsregion für *E. coli*. Die Beschreibung der Konstruktion des Plasmids erfolgt im Text.

Zur Analyse der riboswitchabhängigen Reportergenexpression wurde das Plasmid pGusT konstruiert, bei welchem das β -Glucuronidasegen (*gusA*) jeweils unter Kontrolle verschiedener Promotor-Riboswitchkombinationen gebracht wurde (siehe Abb. 42). Das *gusA*-Gen wurde von pSETGUS (Myronovskiy, *et al.*, 2011) durch zwei aufeinanderfolgende PCRs mit den Oligonukleotiden pGus1–4 (siehe Tab. 9) amplifiziert. Direkt hinter dem Startcodon wurde dabei eine AgeI- und am 3'-Ende eine XbaI-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Das *gusA*-Gen wurde in das Plasmid pAR933a (Rodriguez-Garcia, *et al.*, 2005) eingebracht, wobei es das *tetR*-Gen ersetzte. Dadurch befand sich das *gusA*-Gen in entgegengesetzter Orientierung zu den restlichen genetischen Elementen auf dem Vektor, was ein unerwünschtes Durchlesen (*read-through*) verhindern sollte. Zusätzlich wurde über die XbaI-Schnittstelle stromabwärts des Reportergens ein synthetischer, Rho-unabhängiger Transkriptionsterminator integriert, welcher sich aus den hybridisierten Oligonukleotiden terminator1–4 zusammensetzte.

Die Sequenzen der darauffolgend integrierten Promotoren und Riboswitches sind in Tabelle 21 gezeigt. Es wurden drei konstitutive Promotoren mit unterschiedlich starken Expressionsniveaus gewählt: der schwache *galP2* (Fornwald, *et al.*, 1987), der mittelstarke *ermEp1* (Bibb, *et al.*, 1985) und der sehr starke SF14-Promotor (Labes, *et al.*, 1997). Die drei Promotoren wurden aus den Oligonukleotiden *galP2*-a/b, *ermE*-a/b und SF14-a/b (siehe Tab. 9) hybridisiert und mittels der entstehenden Nukleotidüberhänge in pGusT über die BglII- und Acc65I-Schnittstellen kloniert. Zur Gewährleistung einer erfolgreichen Translation war jeweils neun Nukleotide stromaufwärts des *gusA*-Startcodons AUG die Konsensus-SD-Sequenz 5'-GGAGG-3' integriert. Die Plasmide wurden im Folgenden als pGusT-*galP2*, pGusT-*ermE* und pGusT-SF14 bezeichnet. Sie dienten als Kontrollen zur Messung der promotorabhängigen *gusA*-Expression ohne Riboswitches (im jeweiligen Kontext auch als wt bezeichnet = Wildtyp-Promotor).

Die Riboswitches wurden anschließend zwischen der Transkriptionsstartstelle des Promotors und dem *gusA*-Startcodon integriert. Dabei separierte eine konstante Region die Promotor- und die Riboswitchregion (Tab. 21). Die einzelnen Riboswitchkonstrukte wurden von pBAV1K-A/B/D/E/E* (Topp, *et al.*, 2010) über PCRs unter Verwendung der Oligonukleotide *ribo*-FWD-KpnI und *ribo*-REV-AgeI amplifiziert. Riboswitch C wurde mit dem FWD-Oligonukleotid *ribo*-C-FWD-KpnI von der Matrize pBAV1K-C amplifiziert. Die Riboswitch-amplifikate wurden mit KpnI und AgeI gespalten und in die entsprechend gespaltenen Vektoren pGusT-*galP2*/*ermE*/SF14 eingebracht. Diese zur Messung der Riboswitchaktivität verwendeten Plasmide erhielten die Nomenklatur pGusT-*galP2*-A/B/C/D/E/E*; pGusT-*ermE*-A/B/C/D/E/E* bzw. pGusT-SF14-A/B/C/D/E/E*. Alle Konstrukte wurden durch intergenerische Konjugationen von *E. coli* ET12567/pUZ8002 zu *S. coelicolor* M145 transferiert (siehe Kapitel 3.7.2.2). Die Überprüfung der Integration des jeweiligen Plasmids in den *attB*-Locus von *S. coelicolor* M145 erfolgte durch eine Kolonie-PCR mit anschließender Sequenzierung durch das Oligonukleotid pG_AptA_FWD. Für alle genomisch integrierten Konstrukte konnte eine

korrekte Sequenz des Promotors, Riboswitches und des gesamten *gusA*-Gens bestätigt werden.

Tabelle 21: Sequenzen der in pGusT integrierten Promotoren und Riboswitche.

	Promotorsequenzen
galP2	<i>AGATCTCTCCACCTGGAAC</i> <u>TTTCACTTCCGCCGTACGTCCGGCAAGCTGAAGTTCTC</u> GGGTACC
ermEp1	<i>AGATCTGTTGTGGGCTGGACAAT</i> <u>CGTGCCGGTTGGTAGGATCCAGC</u> GGGTACC
SF14	<i>AGATCTGACCTACGCCTTGACCTTGATGAGGCGGCGTGAGCTACAATCAATACT</i> C <i>GGTACC</i>

	Konstante Region
	AATACGACTCACTATAGGTTCC

	Riboswitchsequenzen
A	----- <u>GGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCC</u> --TGAG AAGGGG ----CAACAAGatgACCGGT
B	----- <u>GGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCC</u> CGCTGCGC AGGGGGT ATCAACAAGatgACCGGT
C	TGATAAGATAGGGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCC----- AAGGGA ----CAACAAGatgACCGGT
D	----- <u>GGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCC</u> --TGCT AAGGTAA ---CAACAAGatgACCGGT
E	----- <u>GGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCC</u> --TGCT AAGGAGGT AACAACAAGatgACCGGT
E*	----- <u>GGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCC</u> --TGCT AAGGAGG ---CAACAAGatgACCGGT

Alle Sequenzen sind in 5'–3'-Richtung angegeben. Promotorsequenzen: Die konstitutiven Promotoren *galP2*, *ermEp1* und SF14 wurden jeweils über BglII (5') und Acc65I (3') kloniert (kursiv dargestellt). Die Promotorsequenz ist unterstrichen und die Transkriptionsstartstelle fett hervorgehoben. Die konstante Region separiert die Promotor- von der Riboswitchregion. Riboswitchsequenzen: Die Sequenz des Theophyllinaptamers ist unterstrichen, die SD-Sequenzen sind fett hervorgehoben und das Startcodon wird in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Agel-Schnittstelle (kursiv) dient zur Klonierung des zu exprimierenden Gens.

4.6.2 Detektion der GusA-Expression auf Festnährböden

Für eine erste qualitative Aussage über den Einfluss der Riboswitche auf die GusA-Expression wurden die Exkonjuganden von *S. coelicolor* M145 pGusT-galP2, pGusT-galP2-A/B/C/D/E/E*, pGusT-ermE, pGusT-ermE-A/B/C/D/E/E*, pGusT-SF14 und pGusT-SF14-A/B/C/D/E/E* auf SM-Festnährböden (\pm Theophyllin) ausgestrichen. Es wurde eine maximale Theophyllinkonzentration von 2 mM gewählt, da sich höhere Konzentrationen negativ auf das Wachstum der *S. coelicolor*-Kulturen auswirkten. Nach 90-stündiger Kultivierung wurden die Nährböden mit dem chromogenen Substrat X-Gluc überschichtet (zur exakten Durchführung siehe Kapitel 3.8.1). Die durch das Erscheinen einer dunkelblauen Verfärbung angezeigte GusA-Expression ist in Abbildung 43 für die jeweiligen Promotor-Riboswitchkombinationen dargestellt (2 h nach Überschichtung). Die Kontrollstämme, bei welchen das *gusA*-Gen unter direkter Kontrolle der konstitutiven Promotoren steht (gekennzeichnet als wt), zeigten eine unterschiedlich starke Expression an (pGusT-SF14 > pGusT-ermE > pGusT-galP2). Die GusA-Expression war dabei unabhängig von der Theophyllinsupplementierung. Im Gegensatz dazu zeigten die Riboswitche A, B, E und E* in Kombination mit allen Promotoren eine Aktivierung der Reportergenexpression auf den supplementierten SM-Festnährböden. Riboswitche B und E ließen in Kombination mit den beiden stärksten Promotoren *ermEp1* und SF14 auch in Abwesenheit von Theophyllin eine GusA-Expression erkennen. Für Riboswitche C und D wurde in keinem der Fälle eine Expression detektiert.

Die Aktivierung der GusA-Expression wurde zusätzlich auf den Festnährböden R2YE und MM getestet, um den Einfluss anderer Medienkomponenten ausschließen zu können (siehe Abb. 44). Hierzu wurde der Stamm *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E* verwendet, welcher in den Experimenten mit SM-Festnährböden die besten Aktivierungseigenschaften zeigte. Bei allen getesteten Nährböden wurde in Abwesenheit von Theophyllin keine GusA-Expression detektiert, wohingegen eine Blaufärbung im mit Theophyllin supplementierten Drittel der Petrischale deutlich sichtbar war. Neben Theophyllin wurde untersucht, ob auch das strukturell nahverwandte Molekül Koffein (2 mM) die *gusA*-Genexpression aktivieren konnte. Wie Abbildung 44 zeigt, war dies nicht der Fall. Diese Ergebnisse sprechen für eine theophyllinspezifische und mediumsunabhängige Aktivität der Riboswitche.

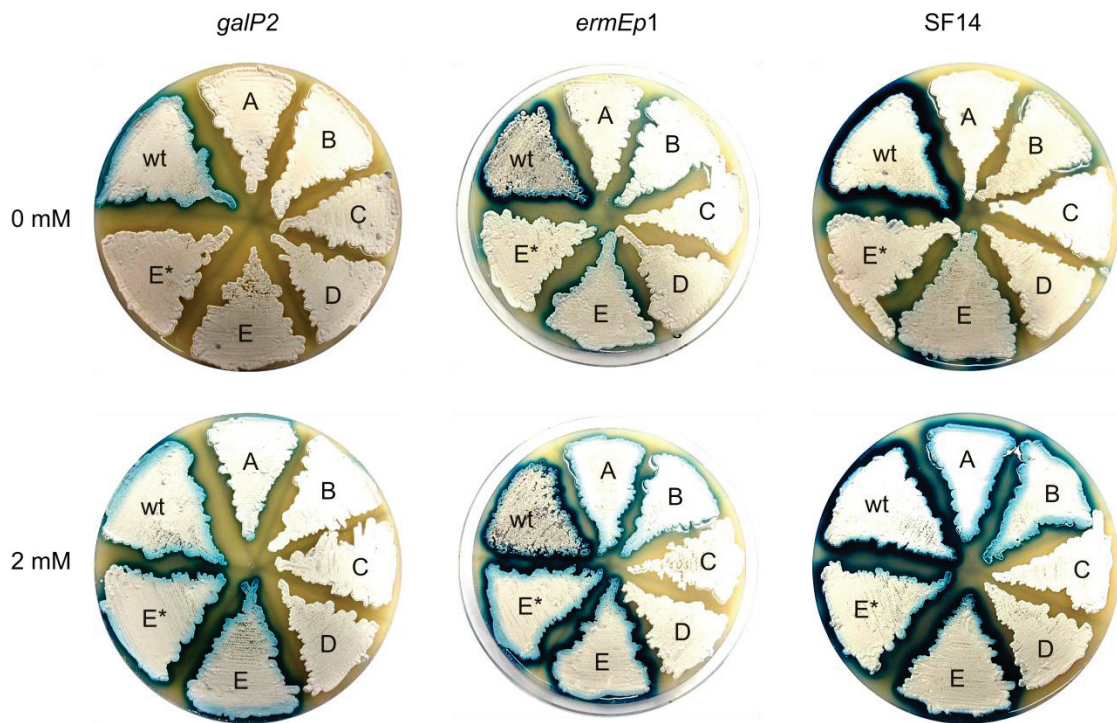


Abbildung 43: Nachweis der GusA-Expression in *S. coelicolor* M145 pGusT-galP2 (wt), pGusT-galP2-A/B/C/D/E/E*, pGusT-ermE (wt), pGusT-ermE-A/B/C/D/E/E*, pGusT-SF14 (wt) und pGusT-SF14-A/B/C/D/E/E* durch Überschichtung mit X-Gluc. Die Kultivierung der Stämme erfolgte 90 h auf SM-Festnährmedium, welches ggf. mit 2 mM Theophyllin supplementiert wurde.

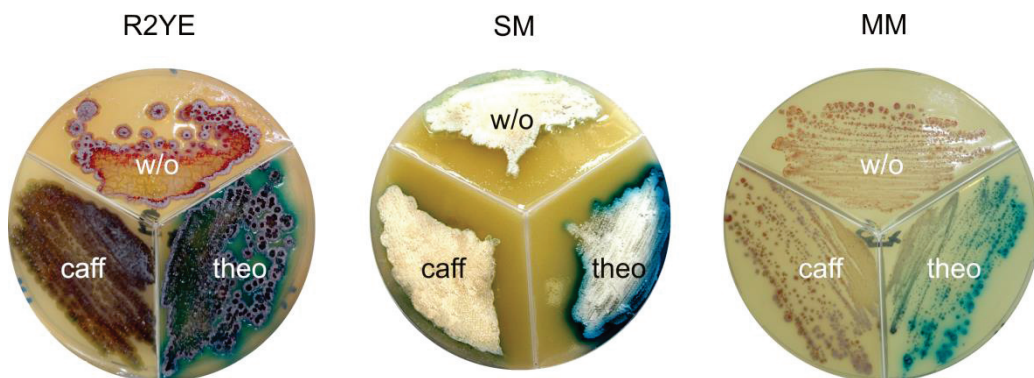


Abbildung 44: Nachweis der GusA-Expression in *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E* auf verschiedenen Festnährböden durch Überschichtung mit X-Gluc. Die einzelnen Drittel der Petrischalen wurden mit 2 mM Theophyllin oder Koffein supplementiert. w/o = ohne Supplementierung. Die Kultivierungsdauer betrug 90 h.

4.6.3 Bestimmung der GusA-Aktivität von Flüssigkulturen

Zur Quantifizierung der theophyllinabhängigen GusA-Expression wurden die genetisch modifizierten *S. coelicolor*-Stämme in Flüssigkulturen angezogen. In allen nachstehend dargelegten Experimenten erfolgte die Kultivierung in 3% TSB-Flüssigmedium für 90 h (mit Ausnahme der Induktions-/Repressionsstudien, denen eine andere Kultivierungsdauer zugrunde lag). Anschließend wurden Gus-Messungen durchgeführt, wie sie in Kapitel 3.8.1 beschrieben sind. Die ermittelten spezifischen GusA-Aktivitäten [$A_{415} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$] werden fortan durch die Einheit „Gus Units“ [GU] dargestellt.

4.6.3.1 Allgemeiner Einfluss von Theophyllin auf das Kulturwachstum und die GusA-Expression

In den Experimenten auf Festnährböden zeigte sich, dass eine Supplementierung mit Theophyllin >2 mM zu einer Verlangsamung des Koloniewachstums führte (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde der allgemeine Einfluss der Theophyllinkonzentration auf das Kulturwachstum auch für Flüssigkulturen analysiert. Hierzu wurde exemplarisch der Stamm *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E* verwendet. Der Stamm wurde in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen von Theophyllin in Flüssigmedium kultiviert. Nach 90 h wurden Trockengewichtsbestimmungen durchgeführt (siehe Kapitel 3.7.1.2). Der Einfluss von Theophyllin auf das Kulturwachstum ist in Abbildung 45 dargestellt. Es wurde eine leichte Abnahme des Kulturwachstums bei Theophyllinkonzentrationen ≥ 4 mM beobachtet.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob Theophyllin einen generellen Einfluss auf die GusA-Expression der Promotorkontrollstämme ausübt. Nachdem in den Experimenten auf Festnährböden durch 2 mM Theophyllin keine Auswirkungen sichtbar waren, wurden diese Experimente in Flüssigkulturen mit der maximal einsetzbaren Theophyllinkonzentration von 4 mM wiederholt. Die Stämme *S. coelicolor* M145 pGusT-galP2, pGusT-ermE, pGusT-SF14 wurden dazu ohne oder mit 4 mM Theophyllin in Flüssigkulturen angezogen. Wie Abbildung 46 verdeutlicht, zeigten alle Stämme eine konstitutive, von der Theophyllinsupplementierung nahezu unabhängige GusA-Aktivität.

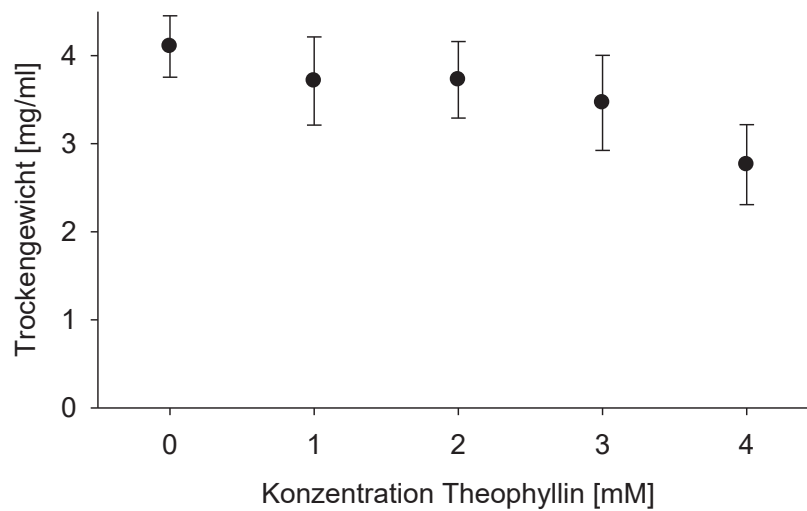


Abbildung 45: Einfluss ansteigender Theophyllinkonzentrationen auf das Kulturwachstum von *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E*. Die Bestimmung erfolgte anhand des Trockengewichts nach 90-stündiger Kultivierung in Flüssigmedium (3% TSB). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

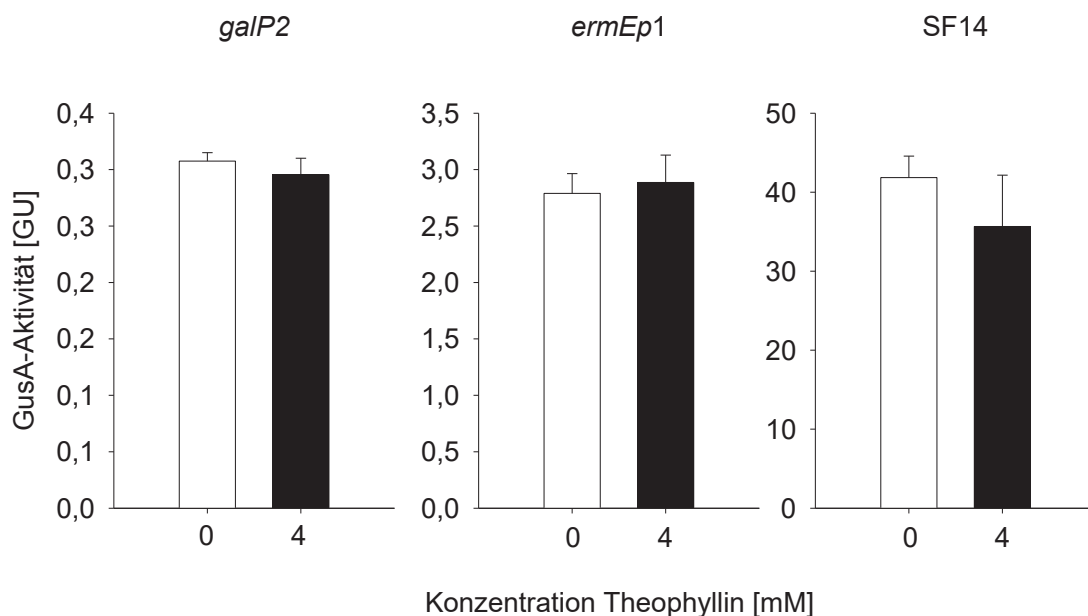


Abbildung 46: Einfluss von Theophyllin auf die GusA-Aktivität der Positivkontrollen *S. coelicolor* M145 pGusT-galP2, pGusT-ermE und pGusT-SF14. Die Supplementierung mit 4 mM Theophyllin (schwarze Balken) erfolgte direkt bei Beginn der 90-stündigen Kultivierung in Flüssigmedium (3% TSB). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

4.6.3.2 Quantifizierung der Riboswitchaktivitäten in Kombination mit dem Promotor *ermEp1*

Die einzelnen Riboswitche sollten nun hinsichtlich ihrer regulatorischen Aktivität vergleichend quantifiziert werden. Hierzu wurde der mittelstarke Promotor *ermEp1* gewählt. Die Stämme pGusT-*ermE*-A/B/C/D/E/E* (sowie pGusT-*ermE* als Kontrolle) wurden ohne oder mit 4 mM Theophyllin in Flüssigmedium kultiviert. Wie die Ergebnisse der Messungen in Abbildung 47 zeigen, konnte für die Riboswitche A, B, E und E* eine Aktivierung der GusA-Expression nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen der Festnährbodenexperimente korreliert. Im Fall der Riboswitche C und D wurde eine sehr niedrige Expression gemessen, die Aktivierungsfaktoren sind daher nicht aussagekräftig. Die geringste Basalexpression der regulatorisch aktiven Riboswitche in Abwesenheit von Theophyllin zeigten A und E*. Sie zeigten auch die größten Aktivierungsfaktoren von 32- bzw. 30-fach. Bei B und E zeigten sich höhere Basalexpressionen, was mit niedrigeren Aktivierungsfaktoren einherging (3- bzw. 12-fach). Kein Konstrukt konnte die Expressionsstärke des Kontrollstamms pGusT-*ermE* erreichen. Die höchste Expression erreichte Riboswitch E mit 43% der Expressionsstärke der Kontrolle. Riboswitch E* zeichnete sich durch eine niedrige Basalexpression in Kombination mit einer hohen aktivierten Expression aus und wurde daher für alle weiteren Tests der Riboswitchaktivität verwendet.

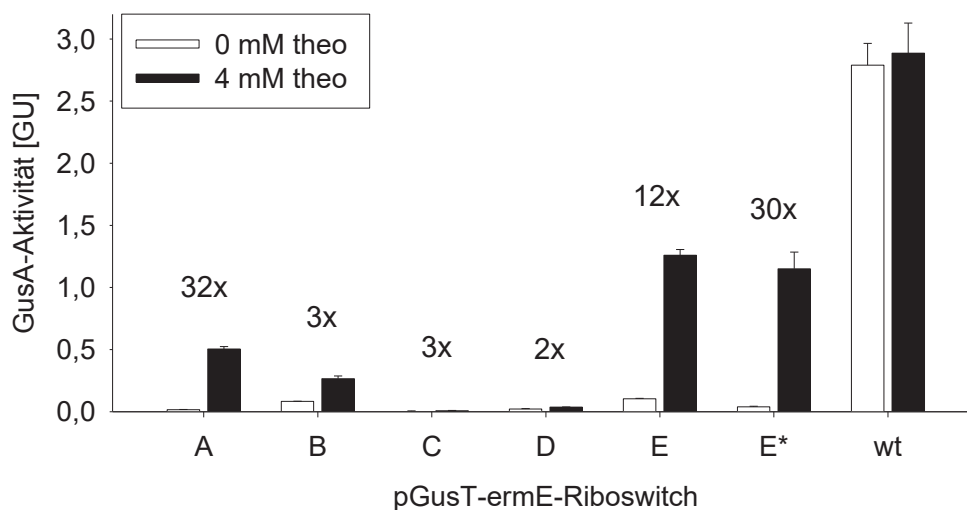


Abbildung 47: Einfluss von Theophyllin auf die GusA-Aktivität von *S. coelicolor* M145 pGusT-*ermE*-A/B/C/D/E/E* und pGusT-*ermE*. Die Supplementierung mit 4 mM Theophyllin erfolgte direkt bei Beginn der 90-stündigen Kultivierung in Flüssigmedium (3% TSB). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

4.6.3.3 Quantifizierung der Aktivität von Riboswitch E* in Kombination mit verschiedenen Promotoren

Die Stärke der Reporterogenaktivierung durch Riboswitch E* sollte auf verschiedenen Expressionsniveaus verglichen werden. Der Riboswitch wurde dazu in Kombination mit einem schwachen (*galP2*), mittelstarken (*ermEp1*) und starken Promotor (SF14) getestet. Hierzu wurden die Stämme *S. coelicolor* M145 pGusT-*galP2*-E*, pGusT-*ermE*-E* und pGusT-SF14-E* ohne oder mit 4 mM Theophyllin in Flüssigmedium kultiviert. Die Daten der GusA-Aktivitäten sind in Abbildung 48 gezeigt. In Abwesenheit von Theophyllin unterband die Integration des Riboswitches E* die Genexpression auf allen Expressionsniveaus. Dieses Verhalten wurde bereits auf den Festnährböden beobachtet (siehe Abb. 43). Die Supplementierung von Theophyllin führte zu einer 29-fachen Aktivierung der GusA-Aktivität für *galP2*. Der gleiche Aktivierungsfaktor wurde in Kombination mit *ermEp1* erreicht, wobei die maximal aktivierte Expressionsstärke doppelt so hoch lag wie bei *galP2*. In Kombination mit SF14 wurde sogar eine 260-fache Aktivierung der Gus-Aktivität erreicht. Dies ist zum einen durch die sehr hohe Expressionsstärke des Promotors zu erklären. Zum anderen kam es in Kombination mit diesem Promotor zu einer unerwartet niedrigen Basalexpression, welche niedriger als die der anderen Promotoren in Kombination mit E* war.

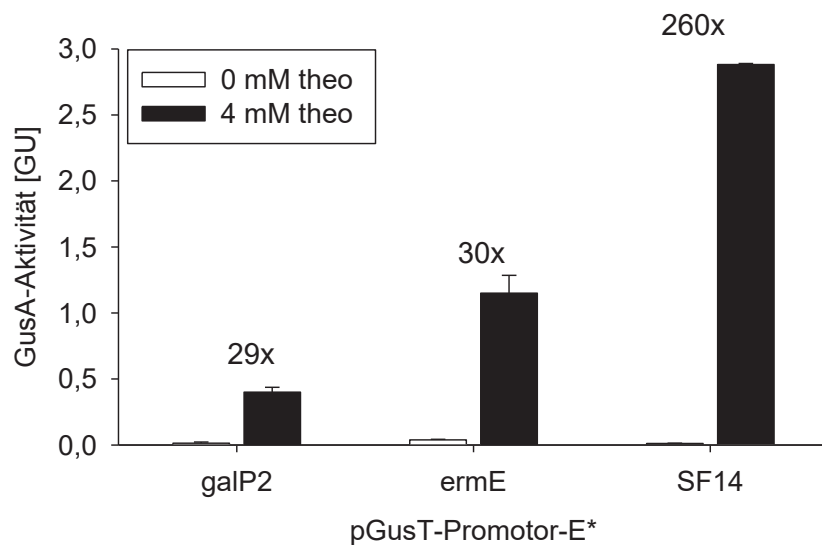


Abbildung 48: Einfluss von Theophyllin auf die GusA-Aktivität von *S. coelicolor* M145 pGusT-*galP2*-E*, pGusT-*ermE*-E* und pGusT-SF14-E*. Die Supplementierung mit 4 mM Theophyllin erfolgte direkt bei Beginn der 90-stündigen Kultivierung in Flüssigmedium (3% TSB). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

In Abbildung 49 wird zusammenfassend dargestellt, dass die Integration des Riboswitches E* stromaufwärts des *gusA*-Gens in Kombination mit allen Promotoren zu einer nahezu vollständigen Reprimierung der Expression in Abwesenheit von Theophyllin führte. Eine theophyllinbedingte Aktivierung der *gusA*-Genexpression auf dasselbe Niveau des jeweiligen Konstruktes ohne Riboswitch konnte jedoch nur im Fall des schwachen Promotors *galP2* erreicht werden. Bei *ermEp1* und SF14 wurden lediglich 42% bzw. 7% der maximalen Expressionsstärke durch eine Supplementierung von 4 mM Theophyllin erreicht.

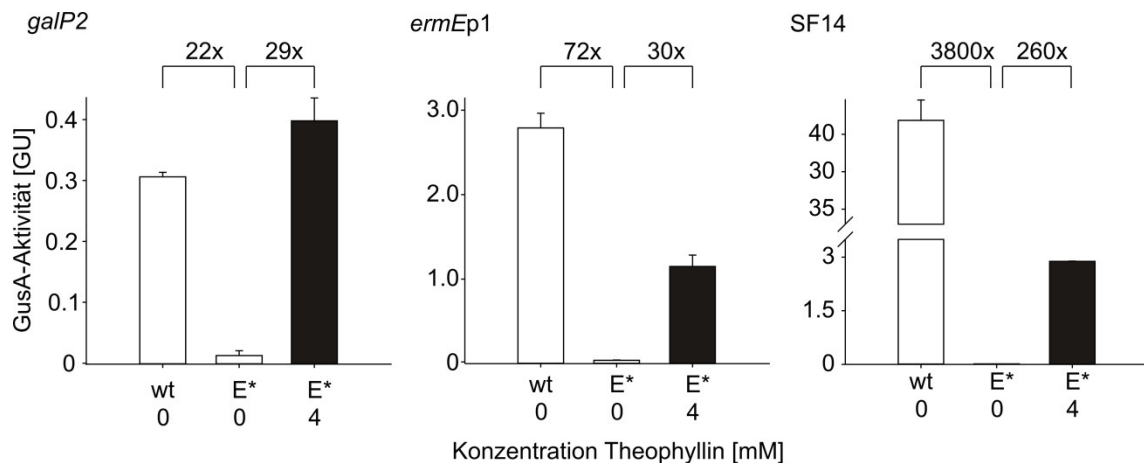


Abbildung 49: Vergleich der GusA-Aktivitäten der Kontrollstämme (wt; ohne Riboswitch) mit den Promotor-Riboswitchkonstrukten E* in Ab- und Anwesenheit von 4 mM Theophyllin. Die Grafik stellt eine Zusammenfassung der Daten aus Abbildung 46 und Abbildung 48 dar und zeigt die Repressions- und Aktivierungsfaktoren der Reportergenexpression.

4.6.3.4 Analyse der dosisabhängigen Regulation durch Riboswitch E*

Die Dosisabhängigkeit der Regulation wurde anhand des Riboswitches E* in Kombination mit dem Promotor *ermEp1* untersucht. Der Stamm *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E* wurde in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Theophyllin (bzw. 4 mM Koffein) in Flüssigmedium kultiviert. Die dosisabhängige Aktivierung der GusA-Aktivität ist in Abbildung 50 dargestellt. Eine Erhöhung der Theophyllinkonzentration führt zu einer proportionalen Steigerung der GusA-Expression, was ein dosisabhängiges Verhalten des Riboswitches indiziert. 4 mM Koffein zeigte indes keine Aktivierung der Reportergenexpression.

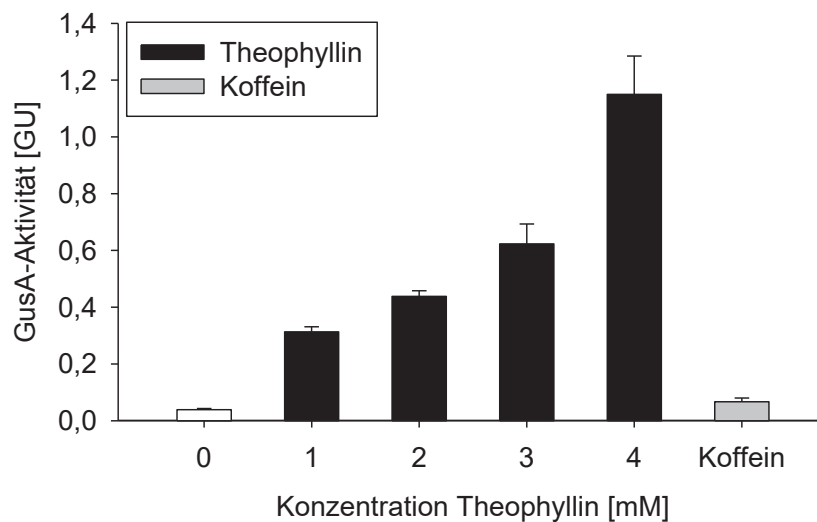


Abbildung 50: Einfluss ansteigender Konzentrationen von Theophyllin bzw. von 4 mM Koffein auf die GusA-Aktivität von *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E*. Die Supplementierung der jeweiligen Konzentration von Theophyllin oder Koffein erfolgte direkt bei Beginn der 90-stündigen Kultivierung in Flüssigmedium (3% TSB). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

4.6.3.5 Kinetik der Reportergeninduktion

Bei allen vorhergehend beschriebenen Experimenten wurden die Nährmedien zu Beginn der Kultivierung mit Theophyllin supplementiert. Nun sollte getestet werden, ob und in welchem Ausmaß die Aktivierung der Reportergenexpression durch eine Induktion während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte. Hierzu wurde der Stamm *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E* in Abwesenheit von Theophyllin in Flüssigmedium (3% TSB) für 48 h kultiviert. Anschließend (Zeitpunkt 0) wurden 4 mM Theophyllin supplementiert. Die GusA-Aktivität wurde 0,5; 2; 4; 8 und 24 h nach dieser Induktion bestimmt, wie in Abbildung 51 gezeigt wird. Es zeigte sich, dass eine erhöhte GusA-Aktivität bereits 4 h nach der Supplementierung mit 4 mM Theophyllin nachweisbar war und nach 8 h ihr Maximum erreichte. Die maximale GusA-Aktivität erreichte dabei ca. ein Drittel des Wertes, wie er bei Supplementierung zu Beginn der Kultivierung erreicht werden konnte (vergleiche GusA-Aktivität bei 4 mM Theophyllin in Abb. 50).

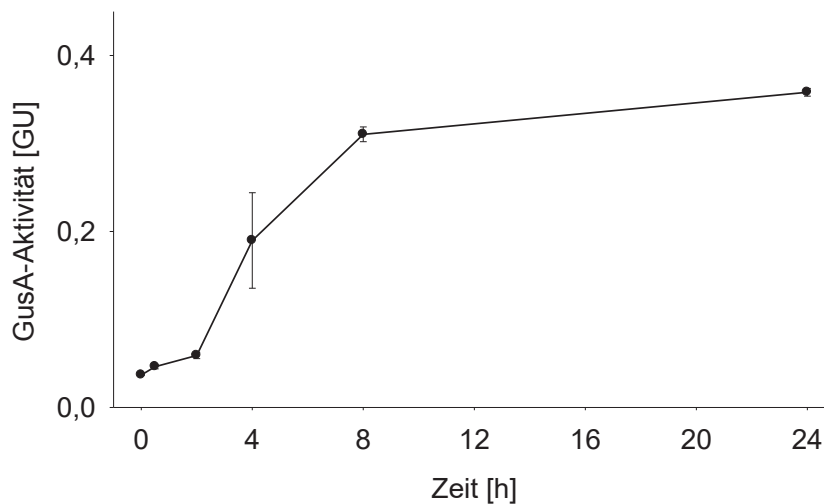


Abbildung 51: Induktion der GusA-Aktivität durch Supplementierung von 4 mM Theophyllin bei *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E*. Die Supplementierung erfolgte nach einer 48-stündigen Kultivierung in Flüssigmedium (3% TSB). Die Kultivierung wurde für 24 h fortgesetzt. Nach 0,5; 2; 4; 8; 12 und 24 h wurden Proben entnommen und zur Analyse der GusA-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

4.6.3.6 Kinetiken der Reportergenrepression

Des Weiteren sollte getestet werden, ob und in welchem Ausmaß die Reportergenexpression durch Entfernen von Theophyllin während der exponentiellen Wachstumsphase reversibel unterbunden werden konnte. Hierzu wurde der Stamm *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E* in Anwesenheit von 4 mM Theophyllin in Flüssigmedium (3% TSB) für 48 h kultiviert. Anschließend (Zeitpunkt 0) wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in neues, theophyllinfreies TSB-Flüssigmedium überführt. Die GusA-Aktivität wurde 0,5; 2; 4; 8 und 24 h nach dieser Auswaschung bestimmt, wie in Abbildung 52 gezeigt wird. Bereits nach 2 h wurde eine Repression der GusA-Aktivität beobachtet. Die Aktivität verringerte sich nach 8 h weiter auf 50% des Ausgangswertes. 24 h nach der Auswaschung von Theophyllin zeigten die Kulturen eine sehr niedrige Reportergenaktivität an, welche vergleichbar mit der von nicht induzierten Kulturen war.

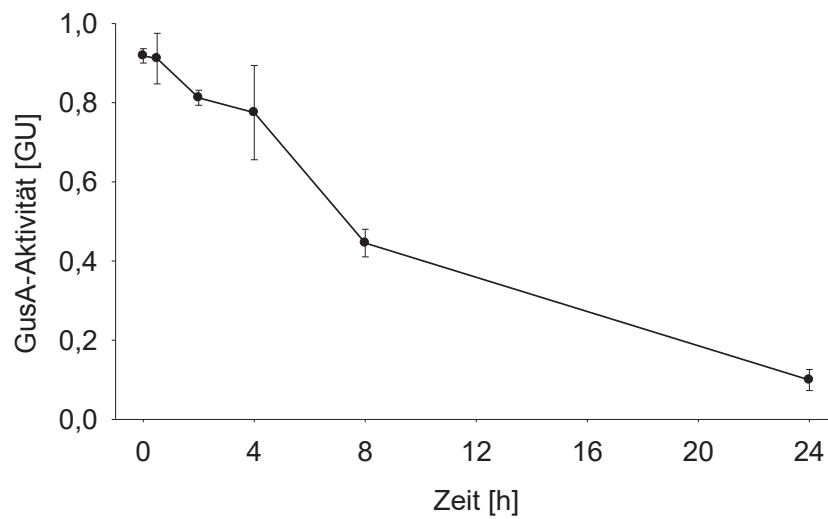


Abbildung 52: Repression der GusA-Aktivität durch Auswaschung von Theophyllin bei *S. coelicolor* M145 pGusT-ermE-E*. Die Auswaschung erfolgte nach einer 48-stündigen Kultivierung in Flüssigmedium (3% TSB) mit 4 mM Theophyllin. Die Kultivierung wurde für 24 h in theophyllinfreiem Flüssigmedium fortgesetzt. Nach 0,5; 2; 4; 8; 12 und 24 h wurden Proben entnommen und zur Analyse der GusA-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit jeweils drei biologischen Replikaten.

5 Diskussion

5.1 Entwicklung photoschaltbarer Aptamer-Ligandenkomplexe

5.1.1 Generelle Betrachtungen zur Wahl des Selektionssystems: Immobilisierung der Zielmoleküle

Die Immobilisierung der Liganden an eine stationäre Phase ist die Voraussetzung für die Separation bindender von nicht bindenden Nukleinsäurespezies während des SELEX-Prozesses. Die gebräuchlichste Separationsmethode ist die säulenbasierte Affinitätschromatographie, wobei die Zielmoleküle zumeist an ein aktiviertes Agarose/Sepharose-Material immobilisiert werden. Im Gegensatz zu dieser Kopplungsstrategie werden auch paramagnetische Partikel als stationäre Phase benutzt. Ein Vorteil ist hier, dass weniger Zielmolekül eingesetzt werden muss, da die Selektion in einem kleineren Volumen stattfindet. Außerdem verlaufen die Selektionen aufgrund des magnetischen Separationsverfahrens deutlich schneller als durch Schwerkraft. Dies erlaubt auch eine Automatisierung und Parallelisierung des SELEX-Prozesses (Wochner, *et al.*, 2007). Es werden entweder streptavidinbeschichtete oder oberflächenaktivierte magnetische Partikel („Beads“) verwendet. Für erstere müssen die Zielmoleküle biotinyliert werden, was für kleine Moleküle mit einem beachtlichen Synthesaufwand verbunden ist. Demgegenüber erfolgt die Biotinylierung von Proteinen simpel über die Aminosäureseitenketten. Die Methode führte bspw. zur Selektion von hochaffinen RNA-Aptameren gegen die HCV RNA-Polymerase (Biroccio, *et al.*, 2002) und gegen den Interleukin-6-Rezeptor (Meyer, *et al.*, 2012). Oberflächenaktivierte magnetische Partikel besitzen hingegen kein gekoppeltes Streptavidin. Auf ihrer Oberfläche befinden sich reaktive Gruppen, wie bspw. Tosyl-, Epoxy- oder Carboxylgruppen. Diese Partikel wurden bis dato insbesondere zur Selektion von DNA-Aptameren genutzt (Mann, *et al.*, 2005, Niazi, *et al.*, 2008, McKeague, *et al.*, 2010, Song, *et al.*, 2012)

Eine Methode, die keine Immobilisierung der Zielsubstanz erfordert, ist die Kapillarelektrophorese-SELEX (CE-SELEX). Hier werden die Aptamer-Ligandenkomplexe durch ein elektrisches Feld in freier Lösung von den nichtgebundenen Nukleinsäuren separiert (Mendonsa & Bowser, 2004). Auch diese Methode ist bevorzugt gegen Proteinliganden anzuwenden, die diese eine große Verzögerung im Migrationsverhalten des gebundenen Komplexes hervorrufen. Sie ist jedoch auch bereits für kleine Moleküle (N-Methylmesoporphyrin, 580 g/mol) angewendet worden, wenngleich die Auflösung der Komplexe und somit die Separation der funktionalen Aptamere deutlich schwieriger ist (Yang & Bowser, 2012).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen die niedermolekularen Azobenzolderivate verwendet. Zunächst wurde

das auf streptavidinbeschichteten Beads-basierende System genutzt. Nachdem sich dieses Verfahren als nicht zielführend erwies, wurde sich dafür entschieden, zur ursprünglichen SELEX-Methode zurückzukehren – der Affinitätschromatographie.

5.1.2 SELEX unter Verwendung paramagnetischer streptavidinbeschichteter Beads

Die Durchführung der *in vitro*-Selektion gegen TH72-Biotin unter Verwendung der Dynabeads® M280 Streptavidin zeichnete sich durch eine einfache Handhabung aus. Innerhalb einer Woche konnte ein RNA-Pool angereichert werden, der in den radioaktiven Bindungsstudien eine Spezifität für die derivatisierten Beads aufwies und nicht an leere Beads band (siehe Abb. 16). Durch die anschließende Sequenzanalyse konnten zehn unterschiedlichen Sequenzen identifiziert werden, in denen sich zwei RNA-Familien herausbildeten. Die restlichen Sequenzen zeigten keine Sequenz- oder Strukturhomologien zueinander.

Radioaktive Bindungsstudien erbrachten das Ergebnis, dass nur die zur Familie 1 gehörenden Sequenzen eine detektierbare Bindung an die azobenzolderivatisierten Beads zeigten. Hierunter wies Sequenz F10 die stärkste Bindung auf. Diese konnte nur an Beads binden, an welchen sich das immobilisierte TH72-Biotin im *trans*-Zustand befand. Gleichzeitig reduzierte sich die Bindung von Aptamer F10 von diesen Beads durch Zugabe von freiem TH72. Zur exakten Ermittlung der Dissoziationskonstanten erfolgten isotherme kalorimetrische Titrations des Aptamers F10 mit TH72 bzw. TH72-Biotin. Hierbei konnten jedoch keine Interaktionen zwischen den RNA-Molekülen und den Liganden detektiert werden. Es war festzustellen, dass die positiven Bindungsstudien unter Verwendung derivatisierter Beads keine Gewährleistung für eine tatsächliche Interaktion der Aptamere mit den freien Zielmolekülen darstellte. Während der Selektion und den Bindungstests war weder die Konzentration der RNA noch des immobilisierten Liganden bekannt. Diese Tatsache könnte auch für die Beobachtungen in den Kompetitionsstudien verantwortlich sein: Es kann vermutet werden, dass es dabei durch einen großen Überschuss an freiem Liganden zu unspezifischen Interaktionen mit der RNA kam.

Generell wurde beobachtet, dass alle bisher im Arbeitskreis durchgeführten *in vitro*-Selektionen von RNA-Aptameren gegen niedermolekulare Substanzen unter Verwendung paramagnetischer Beads erfolglos blieben. Charlotte Kaspar konnte unter meiner Anweisung in ihrer Bachelorarbeit und einer nachfolgenden Labortätigkeit RNA-Pools gegen vier verschiedene Azobenzolderivate anreichern und spezifisch bindende Einzelsequenzen identifizieren (Kaspar, 2013). Dabei wurden neben der UV-Elution (als Alternative zur Hitzeelution) auch unterschiedliche Gegenselektionsschritte implementiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Sequenzen stets Kreuzreaktivitäten zu verschiedenen azobenzolderivatisierten Beads aufzeigten. Beispielsweise lieferte eine SELEX gegen TH-CA-Biotin Einzelsequenzen, welche jedoch ebenso an TH72-Biotin-Beads banden. Alle ITC-Messungen führten stets zum Ergebnis, dass keine hochaffinen Interaktionen zwischen den RNA-Aptameren und den freien Azobenzolderivaten stattfanden.

Zu einem identischen Ergebnis kam auch Florian Groher, welcher in seiner Dissertation eine SELEX gegen Ciprofloxacin mithilfe des hier beschriebenen Protokolls durchführte (Groher, 2015). In dessen Arbeit konnte durch Filterretentionsassays gezeigt werden, dass die identifizierten Aptamere zwar den Komplex aus Streptavidin und dem biotinylierten Zielmolekül erkannten, jedoch ebenso wenig zur Bindung des freien Moleküls imstande waren, wie die hier gezeigten selektierten Sequenzen. In keiner der erwähnten Studien wurden spezifische Affinitätselutionsschritte durchgeführt. Es ist möglich, dass diese Methode im Gegensatz zur thermischen Elution eine geeignetere Möglichkeit darstellen könnte, um ausschließlich ligandenbindende RNA-Moleküle von den Beads zu lösen.

Der generelle Nachteil der Verwendung der Beads ist, dass Streptavidin, gegen welches bereits erfolgreich hochaffine Binder angereichert wurden, eine potentielle Zielstruktur für Aptamere darstellt (Srisawat & Engelke, 2001, Tahiri-Alaoui, *et al.*, 2002). Gerade in Verbindung mit niedermolekularen Verbindungen scheinen benachbarte Epitope der vergleichsweise großen Streptavidinmoleküle zwangsläufig in Interaktionen mit den Nukleinsäuren eingebunden zu werden. In der Literatur finden sich bisher wenige Studien, welche streptavidinbeschichtete Beads zu SELEX-Zwecken eingesetzt haben. Es wurden z.B. DNA-Aptamere gegen Abscisinsäure (Grozio, *et al.*, 2013) oder gegen Daunomycin (Wochner, *et al.*, 2008) selektiert, jedoch sind in der Literatur keine RNA-Aptamerselektionen gegen niedermolekulare Substanzen unter Zuhilfenahme dieser Beads bekannt.

5.1.3 SELEX mittels säulenbasierter Affinitätschromatographie

5.1.3.1 Selektionsbedingungen zur Anreicherung spezifisch bindender RNA-Spezies gegen TH-CA bzw. TH-CA-Amino

In dieser Studie wurde eine NHS-Ester-aktivierte Matrix zur Kopplung der Azobenzolmoleküle verwendet. Dieses Immobilisierungsverfahren kam bereits in vielen SELEX-Studien zum Einsatz, wie bspw. im Falle von Tobramycin oder S-Adenosylhomocystein (Wang & Rando, 1995, Gebhardt, *et al.*, 2000). Zur Selektion von RNA-Aptameren gegen das Azobenzolderivat KRAzR wurde ebenfalls das in dieser Studie verwendete Affi-Gel 10 benutzt. Im Vergleich zu den bräunlichen Dynabeads® erlaubte dieses transluzente Säulenmaterial eine direkte optische Kontrolle über den Kopplungszustand und die Integrität der Azobenzole, da es bei einer Konzentration von 1 mM zu einer sichtbaren Gelbfärbung der Matrix kam. Ein weiterer Vorteil war, dass die gesamte Kopplungsreaktion im wasserfreien Milieu stattfinden konnte, weil die Azobenzole vollständig in DMSO gelöst vorlagen. Hierdurch konnte keine Hydrolyse der aktiven Ester erfolgen, wodurch die Kopplung der Zielmoleküle nicht eingeschränkt wurde.

Die mit den derivatisierten Säulen durchgeführte Affinitätschromatographie war zweifelsohne deutlich zeit-, material- und kostenintensiver als das SELEX-Verfahren mittels Beads. Im Gegensatz zur Selektion mittels der Beads, welche in weniger als einer Woche abgeschlossen war, wurden hierfür ca. zwei Monate benötigt.

Ein grundlegender Vorzug der Affinitätschromatographie lag jedoch darin, dass über die Art, Dauer und Häufigkeit der Wasch- und Elutionsschritte eine hohe Kontrolle über die Stringenz und somit über die Bindeeigenschaften der Aptamere ausgeübt werden konnte. Solche elaborierten Protokolle liegen für das Beads-Verfahren bislang noch nicht vor. Außerdem wurde die säulenbasierte SELEX mit radioaktiv markierter RNA durchgeführt. Dies ließ genauere Auskünfte über die Interaktionen der RNA-Spezies mit den immobilisierten sowie freien Zielmolekülen zu. Der Einfluss der einzelnen Chromatographieschritte auf den Erfolg der *in vitro*-Selektion gegen TH-CA(-Amino) wird im Folgenden dargestellt.

Wie in Abbildung 24 gezeigt wird, wurden unspezifische und spezifische Elutionsmethoden während des SELEX-Verlaufs gewählt. Unspezifische Elutionen wurden mit 20 mM EDTA durchgeführt. Durch die Komplexierung der im SELEX-Puffer vorhandenen Magnesiumionen konnten die dreidimensionalen RNA-Strukturen nicht mehr stabilisiert werden, was mit der Elution der bindenden RNA-Spezies einherging. Dieses Elutionsverfahren führte innerhalb der ersten fünf SELEX-Runden zu einer moderaten Anreicherung einer bindenden RNA-Population. Daneben wurde der Anteil an matrixbindenden RNA-Spezies durch vorgeschaltete Negativselektionen in den ersten drei Runden minimiert. Die von Runde 5 an durchgeführten spezifischen Affinitätselutionen gewährleisteten, dass nur RNA-Moleküle zurückgewonnen wurden, die auch das freie Zielmolekül TH-CA spezifisch erkannten. In Anlehnung an eine Studie von Davis & Szostak wurden zudem Präelutionsschritte mit freien Zielmolekülen im SELEX-Verlauf implementiert (Davis & Szostak, 2002). Hierdurch wurden schwach bindende RNA-Moleküle mit einem schnellen k_{off} -Wert entfernt. Im gleichen Zuge wurde die Dauer der Hauptelutionen erhöht, um auch die Elution der RNA-Spezies mit einem sehr langsamen k_{off} -Wert gewährleisten zu können. Der k_{off} -Wert ist die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation, welcher in folgender Relation zur Dissoziationskonstante steht:

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Anhand der Formel lässt sich ableiten, dass ein gewünschter niedriger K_d -Wert durch eine langsame Dissoziationsrate k_{off} und eine schnelle Assoziationsrate k_{on} bedingt wird. Es ist ebenso möglich, die Selektion auf Aptamere mit einem schnellen k_{on} -Wert zu lenken, indem die Inkubationszeit der RNA-Lösung mit dem immobilisierten Liganden minimiert wird. Diese Methode kam in der hier beschriebenen SELEX jedoch nicht zur Anwendung.

5.1.3.2 Interpretation der Sequenzierungsergebnisse und Bindungsstudien

Eine Untersuchung von insgesamt 27 Einzelsequenzen aus dem angereicherten Pool nach Runde 9 zeigte, dass einige Sequenzen zwar mehrfach vorkamen, aber die einzelnen Klone keine konservierten Motive in ihrer Sequenz oder Struktur untereinander aufwiesen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass deutlich mehr Einzelsequenzen analysiert werden müssten, um eine verlässliche Aussage über das Vorkommen von RNA-Familien zu treffen. Es ist dennoch möglich, dass einmalige, keiner Familie zuzuordnende Sequenzen in einem angereicherten

Pool vorkommen, welche gute bis sehr gute Bindeeigenschaften aufweisen. Davis und Szostak begründeten das Auftreten dieser „orphans“ damit, dass diese häufig einen sehr hohen Informationsgehalt haben. Das bedeutet, dass viele Nukleotide in den Erkennungssequenzen hochgradig spezifiziert sein müssen, was wiederum die Vorkommenswahrscheinlichkeit innerhalb der zufälligen Nukleinsäurebibliothek minimiert (Davis & Szostak, 2002).

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier Aptamere gegen die Azobenzole durch Bindungsstudien näher charakterisiert. Es wurde dargelegt, dass die Bindung ausschließlich an derivatisiertem und nicht an leerem Säulenmaterial erfolgte und dass diese Interaktionen durch das freie Zielmolekül TH-CA spezifisch kompetitiert werden konnten. Die durchgeführten Sequenzverkürzungen waren in den meisten Fällen nicht zielführend. Die konstanten 5'- und 3'-Bereiche schienen tatsächlich einen entscheidenden Einfluss auf die Strukturausbildung und -stabilisierung der Aptamerbereiche zu haben oder gar selber an diesen beteiligt gewesen zu sein. Einzig das Aptamer 42 konnte nach einer Verkürzung (42_V1) die Bindeeigenschaften beibehalten (siehe Abb. 30).

5.1.3.3 Photoisomer-spezifische Bindung der Aptamers 42_V1

Für Aptamer 42_V1 konnte eine Photoisomer-spezifische Erkennung der Azobenzole auf zwei Arten festgestellt werden. In ersten Studien wurde gezeigt, dass nur TH-CA_{trans} in der Lage war, das Aptamer von der mit TH-CA-Amino derivatisierten Säule zu eluieren. Eine einminütige UV_{365 nm}-Bestrahlung war ausreichend, um das Elutionsvermögen auf den Hintergrundwert herabzusetzen, da nun mehrheitlich das nicht mit dem Aptamer interagierende TH-CA_{cis} vorlag. Die Elution konnte durch eine anschließende Weißlichtbestrahlung des Liganden wiederhergestellt werden, was die Reversibilität des Systems unterstrich. Diese Bevorzugung des *trans*-Isomers von TH-CA durch Sequenzen 42 und 42_V1 konnte nachfolgend in ITC-Messungen eindeutig bewiesen werden. Für diese RNA-Azobenzolinteraktionen wurden Dissoziationskonstanten ermittelt, die vergleichbar zu denen bereits identifizierter Aptamere gegen Photoschalter sind (siehe nachfolgendes Kapitel 5.1.4). Interessanterweise wurde eine stärkere Interaktion der Aptamere mit dem Molekül TH-CA-Amino als mit dem zur Affinitätselution genutzten TH-CA ermittelt. Es wird hiermit die Hypothese aufgestellt, dass es durch die in den ersten fünf Runden des SELEX-Verlaufs durchgeführten unspezifischen EDTA-Elutionen zur Anreicherung von RNA-Spezies kam, deren Bindung auch den Aminolinker einbezog (im gekoppelten Zustand geht die Aminogruppe eine stabile Amidbindung zu einem zehn Atome langen „Spacer-Arm“ des Affi-Gel 10 ein, siehe Produktbeschreibung). Es ist denkbar, dass eine spezifische Affinitätselution mit TH-CA direkt ab der ersten SELEX-Runde die Spezifität hinsichtlich diesen Moleküls begünstigen könnte.

Durch Belichtungsstudien konnte für beide Liganden in den ITC-Messungen nachgewiesen werden, dass ausschließlich die *trans*-Formen gebunden wurden. Dabei unterschieden sich die ermittelten Werte für die Enthalpie- und Entropieänderungen für die Liganden TH-CA_{trans} und TH-CA-Amino_{trans} (siehe Abb. 37). Für TH-CA_{trans} wurden größere negative entropische Beiträge

gemessen, welche typisch für lokale Umfaltungen der RNA während der Ligandenbindung sind (Gilbert, *et al.*, 2006). Im Fall von TH-CA-Amino wurde ein signifikant niedrigerer Entropieverlust (aber auch ein geringerer enthalpischer Beitrag) festgestellt. Es könnte spekuliert werden, dass hier weniger ligandeninduzierte Umfaltungen stattfanden, da bereits vorgeformte Aptamerstrukturen ausgebildet waren. Diese theoretischen Annahme wird derzeit durch RNA-Strukturaufklärungen mittels *in-line probing* (Regulski & Breaker, 2008) untersucht.

Für die Interaktionen der Aptamere 42 und 42_V1 mit den *cis*-Isomeren der Azobenzole konnten aufgrund technischer Limitationen des ITC-Messverfahrens keine Aussagen über die K_d -Werte getroffen werden. Es bleibt somit zu klären, wie stark das Aptamer tatsächlich zwischen den Photoisomeren diskriminieren kann. Eine interessante Entdeckung lieferten indes die ITC-Messungen für Aptamer 64 und TH-CA, bei denen eine UV-induzierte Isomerisierung zu TH-CA_{cis} lediglich zu einer Verminderung, jedoch nicht zum Verlust der Interaktionsfähigkeit im Vergleich zu TH-CA_{trans} führte. Diese Beobachtung könnte so interpretiert werden, dass sich die Bindung von Aptamer 64 auf Molekülgruppen bezog, welche nicht in direkter Nähe zur Azogruppe lokalisiert sind. Die photoinduzierten strukturellen Änderungen im Molekül wirkten sich dadurch nicht so „nachteilig“ wie im Falle der Aptamere 42 bzw. 42_V1 aus, bei denen möglicherweise die eigentliche Azobenzoleinheit in der Interaktion mit dem Aptamer involviert ist. Zur Aufklärung der Aptamer-Azobenzolkomplexe müssten hierzu Untersuchungen der Kristallstrukturen erfolgen.

5.1.4 Gegenüberstellung existierender photoschaltbarer Aptamer-Ligandenkomplexe

Es wurde bereits einleitend erwähnt, dass in mehreren Laboren *in vitro*-Selektionen von RNA-Aptameren gegen photochrome Moleküle durchgeführt wurden bzw. gegenwärtig werden (siehe Kapitel 2.5.2). In Tabelle 22 erfolgt eine Gegenüberstellung der photoschaltbaren Aptamer-Ligandenkomplexe.

Tabelle 22: Gegenüberstellung photoschaltbarer Aptamer-Ligandenkomplexe.

Studie	Ligand; Substanzklasse (MW)	Spezifität	Anwendung; Anmerkung
vorliegende Studie	TH-CA/-Amino; Azobenzol (426,25 / 483,35 g/mol)	$K_d \sim 0,8 \mu\text{M}$, keine Erkennung der <i>cis</i> - Photoisomere	wird derzeit erprobt (<i>in vivo</i> -Screening); wasserlöslich
Hayashi, <i>et al.</i> , 2007	KRAzR; Azobenzol (695,82 g/mol)	$K_d \sim 0,8 \mu\text{M}$, 10-fache Unterscheidung von KRAzR _{trans} zu KRAzR _{cis}	keine Anwendung; wasserlöslich
Young & Deiters, 2008	Nitrospiro- benzopyran; Spiropyran (423,26 g/mol)	$K_d \sim 10 \mu\text{M}$, 14-fache Unterscheidung von Spiropyran- zu Merocyaninform	keine Anwendung; schlecht wasserlöslich
Lee, <i>et al.</i> , 2007	BDHP-COOH; Dihydropyren (438,60 g/mol)	$K_d \sim 2 \mu\text{M}$, 35-fache Unterscheidung von BDHP- zu BCPD- Form	<i>in vitro</i> -funktionales, allosterisch reguliertes Hammerhead-Ribozym

Die Studien von Hayashi *et al.* kommen dabei der in dieser Dissertation durchgeführten Selektion am nächsten (Hayashi, *et al.*, 2007, Hayashi, *et al.*, 2009). Bei dem Zielmolekül KRAzR wurde das Azobenzolgrundgerüst mit den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin substituiert (siehe Abb. 8a). Die Intention dieser Substitutionen lag in der Annahme, dass die Guanidiniumgruppen des Arginins elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen zu den Nukleobasen der RNA eingehen können. Außerdem weist ein bereits selektiertes Aptamer gegen L-Arginin eine hochspezifische Bindung mit einem K_d -Wert von 330 nM auf (Geiger, *et al.*, 1996). Lysin wurde gewählt, da es über seine primäre ϵ -Aminogruppe an die NHS-Ester aktivierte Agarosematrix immobilisiert werden konnte. Die Gruppe um Hayashi konnte durch das SELEX-Verfahren Aptamere identifizieren, die mit einem K_d -Wert von $\sim 0,8 \mu\text{M}$ eine identische Affinität zur *trans*-Form des Azobenzols zeigten, wie die besten Aptamerkandidaten in der vorliegenden Studie. Sie konnten ebenfalls nachweisen, dass die Affinität des Aptamers zu KRAzR durch UV-Bestrahlung dessen stark gemindert wird, durch Weißlichtbestrahlung jedoch nahezu vollständig wiederhergestellt werden kann. KRAzR zeichnet sich weiterhin durch eine gute Löslichkeit aus (6 mM in wässrigen Puffer, vergleichbar zu TH-CA und TH-CA-Amino). Jedoch liegen keine Studien über die Aufnahme und Toxizität für zelluläre Systeme vor. Ebenso ist bislang keine Anwendung des Aptamer-KRAzR-Komplexes zum Aufbau eines photoschaltbaren Riboswitches bekannt.

Gleiches gilt für die von Young und Deiters generierten Photoisomer-spezifischen RNA-Aptamere gegen ein Spiropyran-derivat. Sie implementierten eine UV-Elution in den SELEX-Prozess und konnten dadurch Aptamere identifizieren, die eine 14-fache Diskriminierung der Spiropyranform gegenüber der UV-induzierten Merocyaninform zeigten. Die ermittelte Affinität lag jedoch lediglich bei einem K_d -Wert von $\sim 10 \mu\text{M}$. Da neben dieser vergleichsweise schwachen Affinität die Löslichkeit des Spiropyrans in wässrigen Lösungen niedrig ist und es zudem als racemisches Gemisch vorliegt, ist eine biologische Anwendung dieses Systems nicht gegeben. Der einzig bisher berichtete Versuch über den Aufbau von lichtabhängigen RNA-Schaltern erfolgte durch Lee und Mitarbeiter (Lee, *et al.*, 2007). Sie identifizierten ein Aptamer gegen die geschlossene Form eines Dihydropyrens, welches eine 35-fache Unterscheidung in seinem Bindeverhalten zur offenen Form zeigte. Lee *et al.* koppelten das erhaltene Aptamer mit einem Hammerhead-Ribozym. Durch ein Screening, bei dem verschiedene Kommunikationsmodule als Vermittler zwischen den beiden Domänen eingesetzt wurden, erhielten sie ein allosterisch reguliertes Ribozym, welches eine lichtabhängige Aktivität zeigte. Die Ribozymsspaltung konnte erst durch die lichtinduzierte Überführung der offenen in die geschlossene Dihydropyrenform aktiviert werden, womit Lee *et al.* einen Schalfaktor von 900 *in vitro* erzielten. Dieses Beispiel ist eindrucksvolles Vorbild für die Konstruktion lichtabhängiger RNA-Schalter.

5.1.5 Konstruktion photoschaltbarer Riboswitche

Keiner der photoschaltbaren Aptamer-Ligandenkomplexe, welche im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden, fand bislang eine Anwendung in einem *in vivo* RNA-Schalter, da insbesondere die Eigenschaften der Zielmoleküle für biologische Zwecke ungeeignet sind. Neben einer schlechten Wasserlöslichkeit, wie im Falle des Spiropyrans von Young und Deiters und ungeklärter Zellpermeabilität haben alle Systeme den Nachteil, dass sie mit Licht im kurzwelligen Spektralbereich geschaltet werden. Je kürzer die Wellenlänge der UV-Strahlung ist, desto energiereicher ist sie. Je nach Intensität und Dosis der Strahlung können die UV-Photonen zytotoxische Effekte auslösen, die hauptsächlich auf die Schädigung der DNA zurückzuführen sind (Sinha & Hader, 2002). *In vitro*-Studien zeigten, dass ebenfalls die RNA photochemischen Modifikationen ausgesetzt ist. Sie wird insbesondere von kurzwelliger UV-Strahlung (254 nm) geschädigt, wohingegen UV-Bestrahlungen im Wellenlängenbereich $>350 \text{ nm}$ keine nachweisbaren negativen Effekte ausüben (Wurtmann & Wolin, 2009, Kladwang, *et al.*, 2012).

An einen „idealen Photoschalter“ werden folgende Anforderungen gestellt: Neben der erwähnten Löslichkeit und Zellgängigkeit, dürfen die Moleküle für keines der beiden Photoisomere eine Zytotoxizität hervorrufen. Ebenso müssen sie eine gute intrazelluläre Stabilität aufweisen. Azobenzolderivate können in der Zelle durch Glutathion reduziert werden (Boulègue, *et al.*, 2007), wohingegen spiropyranbasierte Photoschalter insbesondere durch Hydrolyse unwirksam gemacht werden können (Stafforst & Hilvert, 2009).

Um die Genexpression effizient steuern zu können, müssen die photochemischen Schalteigenschaften der Moleküle auf das biologische System abgestimmt sein. Die Absorptionsbanden sollten weit auseinanderliegen, um die beiden Photoisomere möglichst vollständig ineinander überführen zu können. Die Schaltvorgänge müssen mit einer hohen Quantenausbeute vonstattengehen und mit einer hohen Zyklenzahl in wässrigen Lösungen ohne Effizienzverlust wiederholt werden können. Die thermische Rückisomerisierung sollte gering sein. Der Wellenlängenbereich des eingesetzten Lichts darf keine Zellschädigungen hervorrufen. Das Schalten sollte eine große Änderung der Konformation und der Distanz der Endgruppen des Moleküls hervorrufen, sodass die Photoisomere deutlich vom Riboswitch diskriminiert werden können. Schlussendlich müssen die Substitutionen so gewählt werden, dass sie viele Interaktionsmöglichkeiten mit der RNA eingehen können.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Zielmolekül TH-CA besitzt viele der oben erwähnten gewünschten Eigenschaften, welche eine Anwendung in einem biologischen System erlauben könnten. Das Molekül an sich bietet insbesondere über die Chloramphenicolinheit viele Gruppen, mit welchen die RNA interagieren kann. Die Substitution wurde gewählt, da bereits erfolgreich RNA-Aptamere gegen dieses Antibiotikum selektiert wurden, welche sich durch K_D -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich auszeichnen (Burke, *et al.*, 1997). Weiterhin zeigte TH-CA eine gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Unter Verwendung von PBS-Puffer konnten Thomas Halbritter und Sabrina Steinwand ermitteln, dass das Azobenzol mindestens 25 Schaltvorgänge zwischen der *trans*- und *cis*-Form ohne einen sichtbaren Effizienzverlust überstand (Publikation in Vorbereitung). Zudem wurde eine sehr langsame Rückisomerisierungsrate von *cis* zu *trans* bestimmt, wobei das *cis*-Isomer bis zu 40 Tage bei Raumtemperatur und Dunkelheit stabil bleiben konnte. Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass wie für die drei im vorherigen Kapitel beschriebenen Photoschalter auch hier UV-Licht für die Durchführung der Schaltvorgänge notwendig ist. Daher bleibt im Falle der Anwendung eines Riboswitches zu prüfen, welche Auswirkungen die Strahlung auf das jeweilige Testsystem (bspw. Hefe- oder HeLa-Zellen) hat. In HeLa-Zellextrakten konnte unterdessen eine Stabilität des Azobenzols für mehr als 24 Stunden gewährleistet werden. In Kapitel 5.1.6 wird gezeigt, wie ein TH-CA-abhängiges Riboswitchsystem zur Kontrolle der Genexpression in *S. cerevisiae* aufgebaut und genutzt werden soll.

Walsh *et al.* konnten als erste Forschergruppe zeigen, dass eine intrazelluläre Aktivierung eines Riboswitches durch einen photoaktivierbaren Liganden möglich ist (Walsh, *et al.*, 2014). „Photoaktivierbar“ bedeutet in diesem Fall, dass sie den Liganden Theophyllin mit einem sogenannten „cage“ versehen haben. Dies sind photolabile Schutzgruppen, welche durch die Bestrahlung von Licht geeigneter Wellenlänge abgespalten werden und so das biologisch aktive Molekül freigeben. Es wurde gezeigt, dass das photoaktivierbare Theophyllin zellpermeabel und zugleich nicht toxisch in *E. coli* ist. Nur nach Abspaltung der photolabilen Gruppe durch Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) war Theophyllin in der Lage, den von Gallivan *et al.* entwickelten synthetischen Riboswitch (beschrieben in Kapitel 2.4.2.2) zu aktivieren. Ein

grundlegender Nachteil dieses Ansatzes ist, dass der Prozess im Gegensatz zu den Photoschaltersystemen inhärent irreversibel ist. Nichtsdestotrotz stellt der *caging*-Ansatz zum gegenwärtigen Zeitpunkt das einzige zuverlässige und zielgerichtete System zur lichtinduzierten Aktivierung von Riboswitchen in lebenden Zellen dar.

5.1.6 Konstruktion azobenzolabhängiger Riboswitche

In ersten Studien wurde die *in vivo*-Anwendbarkeit der hier selektierten Aptamer-Azobenzolkomplexe in *S. cerevisiae* getestet. Zunächst sollte eine Auskunft über die Toxizität bzw. die Aufnahme der Azobenzole in die Zellen getroffen werden. Dies stellte sich jedoch insofern als schwierig heraus, da TH-CA bzw. TH-CA-Amino einen gegensätzlichen – negativen oder positiven – Einfluss auf die GFP-vermittelte Fluoreszenz ausübten. Die optische Dichte der Kulturen der Reporterstämme wurde jedoch nicht beeinflusst. Zur exakten Bestimmung des Verhältnisses von extrazellulären zu intrazellulären Ligandenmolekülen müssten sensitivere Verfahren angewendet werden, wie etwa HPLC-Messungen oder radioaktive Aufnahmestudien. An dieser Stelle sei angemerkt, dass viele der in der Literatur beschriebenen *in vitro*-selektierten Aptamere zu keiner *in vivo*-Applikation nutzbar sind, da ihre Liganden entweder toxisch wirken oder anderenfalls über keine oder eine sehr niedrige Zellpermeabilität verfügen (Beisel & Smolke, 2009, Berens & Suess, 2014).

Bei der Konstruktion der azobenzolabhängigen Riboswitche zeigte sich eine weitere Herausforderung, die insbesondere das Design eukaryotischer Riboswitche betrifft. In anderen Studien wurde beobachtet, dass die Integration von Aptameren in den 5'-untranslatierten Bereich bereits in Abwesenheit des Liganden zu einer starken Reduzierung der Genexpression führte (Suess, *et al.* 2003 und persönliche Kommunikation J. Weigand und C. Schneider). Im Vergleich zu höheren Eukaryoten sind die 5'-UTRs bei *S. cerevisiae* deutlich seltener durch strukturierte Bereiche gekennzeichnet (Kertesz, *et al.*, 2010, Robbins-Pianka, *et al.*, 2010, Tuller, *et al.*, 2010). Gleichzeitig zeigt die Genexpression ein sensitiveres Verhalten gegenüber RNA-Strukturen, wie bspw. Haarnadelschleifen, was mit einer erschwerten Entwindung durch die Helikaseaktivität des Ribosoms in Zusammenhang gebracht wird (Parsyan, *et al.*, 2011). Oliveira *et al.* wiesen nach, dass stabile Stammschleifen mit einer Faltungsenergie von -18 kcal/mol bereits zu einer 89%-igen Translationsrepression für das von ihnen getestete Reportergen führten. Es ist daher von großem Interesse für das Riboswitchdesign über möglichst kurze definierte Aptamersequenzen zu verfügen, die die vollständigen Bindeeigenschaften beibehalten haben. Das mit 42 Nukleotiden kurze Aptamer 42_V1 erfüllte diese Anforderungen. Die in Abbildung 40a gezeigte Strukturvorhersage des in den 5'-UTR integrierten Aptamers zeigte eine Faltungsenergie von ca. -16 kcal/mol. Diese relative stark vorgeformte Struktur könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Expression des GFP-Reportergens bis auf ein Minimum zurückging (siehe Abb. 41). Ein Grund für die ausgeprägte Struktur ist vor allem in dem bereits in der Bibliothek vorgegebenen Stammschleifenbereich zu sehen (vgl. Abb. 11b). Dieser enthält einen der am stabilsten vorkommenden Tetraloops:

C(UUCG)G (Antao, *et al.*, 1991). Antao *et. al* zeigte, dass bereits eine Mutation der den Tetraloop umgebenden Nukleotide von C(UUCG)G zu G(UUCG)C zu einer Halbierung der Faltungsenergie führte. Diese konnte durch Mutationen innerhalb der eigentlichen Tetraloop-Nukleotide von UUCG zu UUUU weiter minimiert werden.

Für das Konstrukt pWHEMMR-42loop, bei dem exakt diese Nukleotidaustausche durchgeführt wurden (gezeigt in Abb. 40d), konnte eine geringere Faltungsenergie von -12,5 kcal/mol festgestellt werden, wobei die vorhergesagte Sekundärstruktur nicht beeinflusst wurde. Tatsächlich wiesen die Reporterstämme, die mit diesem Plasmid transformiert wurden, nun eine messbare GFP-Expression auf. Leider war diese jedoch nicht von der Zugabe der Azobenzolliganden TH-CA oder TH-CA-Amino abhängig. Dies könnte drei Gründe haben: (i) Die Azobenzole wurden nicht aufgenommen bzw. lagen in einer zu niedrigen intrazellulären Konzentration vor, (ii) durch die Mutation des Tetraloops wurde die Affinität zwischen RNA und Ligand negativ beeinflusst oder (iii) das Aptamer zeigt keine ligandenvermittelte stabilisierende Umstrukturierung, die mit einer Translationsrepression einhergehen würde. Als weiterer Schritt zur Identifizierung azobenzolabhängiger Riboswitche werden derzeit angereicherte Pools aus unterschiedlichen Runden der SELEX gegen TH-CA durch *in vivo*-Screenings nach der etablierten Methode getestet (Weigand, *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass die Verwendung der in dieser Arbeit gewählten RNA-Bibliotheken grundsätzlich suboptimal für *in vivo*-Applikationen sein könnte, da die vorgefalteten Strukturen (Tetraloops bzw. Paarung der konstanten Bereiche) bereits einen zu großen inhibitorischen Effekt auf das Reportersystem ausüben können. Die SELEX gegen TH-CA könnte mit einer weniger strukturierten, flexibleren Bibliothek wiederholt werden. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz einer N₇₄-Bibliothek (Famulok, 1994), die für Selektionen gegen Neomycin und Tetracyclin verwendet wurde und in deren angereicherten Pools *in vivo*-funktionale Aptamere identifiziert werden konnten (Wallis, *et al.*, 1995, Berens, *et al.*, 2001, Suess, *et al.*, 2003, Weigand, *et al.*, 2008).

5.2 Riboswitchkontrollierte Expressionssysteme in *S. coelicolor*

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde erstmalig die Anwendung synthetischer Riboswitches für einen Vertreter der antibiotikaproduzierenden Gattung *Streptomyces* beschrieben. Im Folgenden soll diskutiert werden, wie sich die theophyllinabhängigen Schalter zur konditionalen Genexpression in *S. coelicolor* eignen. Dabei werden Vergleiche zu anderen Bakterienspezies hergestellt, für welche diese Riboswitches bereits erfolgreich implementiert wurden. Darüber hinaus werden die Regulationseigenschaften der Riboswitches mit denen bereits etablierter Genexpressionssysteme in Streptomyceten gegenübergestellt. Es soll die Frage geklärt werden, ob diese RNA-Schalter eine geeignete Alternative zu den konventionellen proteinbasierten konditionalen Expressionssystemen darstellen können.

5.2.1 Beurteilung der unterschiedlichen regulatorischen Aktivitäten der Riboswitches in *S. coelicolor* und Vergleich zu anderen Bakterienspezies

In allen bisher untersuchten Bakterienspezies zeigte mindestens eine Variante der insgesamt sechs verschiedenen Riboswitches (Topp, *et al.*, 2010) eine strikte theophyllinabhängige Kontrolle der Genexpression, verbunden mit einem hohen Aktivierungsfaktor. In der Hauptstudie konnten Topp *et al.* neben den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* auch die Anwendbarkeit für die humanpathogenen Stämme *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter baumannii* und *Mycobacterium smegmatis* zeigen, für welche es bislang keine verlässlichen Induktionssysteme gab (Topp, *et al.*, 2010). In weiteren Studien wurde das System für die ebenfalls klinisch relevanten Bakterienarten *Mycobacterium tuberculosis* (Seeliger, *et al.*, 2012) und *Francisella tularensis* (Reynoso, *et al.*, 2012) etabliert. Im Cyanobakterium *Synechococcus elongatus*, einem Modellorganismus für die Photosynthese, wurden durch die Schalter hohe Aktivierungsfaktoren (~ 190-fach) für die Expression eines Luziferasereportergens erzielt (Nakahira, *et al.*, 2013). Zudem konnte hier über den Riboswitch der circadiane Rhythmus gesteuert werden.

In den aufgeführten Studien war stets zu beobachten, dass die einzelnen Riboswitches A–E* sehr unterschiedliche Aktivierungsfaktoren zeigten. Ein Vergleich dieser Faktoren zwischen den untersuchten Bakterienspezies ist schwer möglich, da sich der genetische Kontext (Promotor, Kopienzahl der Plasmide) sowie die zur Messung verwendeten Reportergene unterschieden. In der vorliegenden Studie wurden die Riboswitch-Reportergenkonstrukte jeweils als einfache Kopie in das *S. coelicolor*-Genom integriert, um Schwankungen in der Kopienzahl von Plasmiden zu vermeiden. Es wurde ein erst kürzlich für Actinomyceten entwickeltes β -Glucuronidasereportersystem verwendet (Myronovskyi, *et al.*, 2011). Dieses ließ durch eine Visualisierung auf Festnährböden eine rasche qualitative Aussage über die Stärke der Reportergenexpression zu, welche überdies einfach in Flüssigkulturen quantifiziert werden konnte. Für die mit den Reportergenplasmiden transformierten *S. coelicolor* M145-Kulturen zeigte sich auf Festnährböden (Abb. 43) und in Flüssigkulturen (Abb. 47) übereinstimmend,

dass die Riboswitche A, B, E und E* imstande waren, die GusA-Expression theophyllinabhängig zu regulieren. Dabei konnte die regulatorische Aktivität in Kombination mit allen Promotoren (*galP2*, *ermEp1* und SF14) gezeigt werden. Die Riboswitche C und D zeigten keine Aktivität. Durch die Quantifizierung der GusA-Aktivität in Kombination mit *ermEp1* wurde ersichtlich, dass sich die Riboswitche in ihrer jeweiligen basalen und aktivierbaren Expression unterschieden, wodurch die Aktivierungsfaktoren beeinflusst wurden (Abb. 47). Diese unterschiedlichen Expressionsniveaus der einzelnen Riboswitche werden folgend in einen kausalen Zusammenhang mit ihrer SD-Sequenz gebracht, welche für die Initiation der Translation von entscheidender Bedeutung ist.

Die sechs verwendeten Riboswitche unterscheiden sich hauptsächlich in der jeweiligen SD-Sequenz. Die Effizienz der Translationsinitiation ist in Prokaryoten stark von der Komplementarität zwischen der SD- und anti-SD-Sequenz, sowie von der Entfernung der SD-Sequenz zum Startcodon abhängig (Ma, *et al.*, 2002). Die anti-SD-Sequenz befindet sich am 3'-Ende der 16S rRNA, welche ein Bestandteil der kleineren 30S-Untereinheit des Ribosoms ist. Sie trägt bei *S. coelicolor* die Nukleotidabfolge 3'-UCUUUCCUCCACUAG-5' (der Kernbereich ist unterstrichen). Das dementsprechende Minimalmotiv für die SD-Sequenz ist 5'-GGAGG-3' (Baylis & Bibb, 1987, Strohl, 1992).

Tabelle 23: Komplementarität der SD-Sequenzen der Riboswitche A–E* zur anti-SD-Sequenz.

Riboswitch	Komplementarität mit der anti-SD der 16S rRNA 3'-UCUUU <u>CCUCC</u> ACUAG-5'	Paarungen (inkl. Wobble)
A	5'-C-UGAG GAAGGGG ----CAACAAGAU G -3'	5 (7)
B	5'-CGCUGCGC AGGGGGU AUCAACAAGAU G -3'	6 (7)
C	5'------ AAGGGA ----CAACAAGAU G -3'	4 (5)
D	5'-C-UGCU AAGGUAA ---CAACAAGAU G -3'	4
E	5'-C-UGCU AAGGAGGU AACAACAAGAU G -3'	8
E*	5'-C-UGCU AAGGAGG ---CAACAAGAU G -3'	7

Übersicht über die Komplementarität (inklusive Wobble-Paarungen) zwischen den SD-Sequenzen der Riboswitche A–E* (jeweils nur die 3'-terminalen Sequenzen, die direkt auf die Theophyllinaptamere folgen, sind gezeigt) und dem 3'-Ende der anti-SD-Sequenz der 16S rRNA von *S. coelicolor*. Der Kernbereich der anti-SD-Sequenz ist unterstrichen. Die komplementären Nukleotide der SD-Sequenzen sind fett hinterlegt und untereinander angeordnet.

Wie in Tabelle 23 dargestellt ist, besitzt der aktive Riboswitch A sieben Nukleotide für die Erkennung durch die 16S rRNA (inklusive Wobble-Paarungen). Die inaktiven Riboswitch C und D haben hingegen nur vier bis fünf komplementäre Nukleotide zur anti-SD-Sequenz. Strohl konnte für *S. lividans* – einem nahen Verwandten von *S. coelicolor* – zwar zeigen, dass eine effektive Translationsinitiation auch von SD-Sequenzen mit geringerer Komplementarität ausgehen kann (Strohl, 1992). Jedoch schienen die SD-Sequenzen der Riboswitch C und D in Kombination mit deren Abständen zum Startcodon nicht die ausreichenden Interaktionsmöglichkeiten mit der 16S rRNA gewährleistet zu haben. Darauf lassen zumindest die gemessenen GusA-Aktivitäten schließen, welche an der unteren Nachweisgrenze der Messmethode lagen. Interessanterweise zeigten die beiden Schalter C und D im Gram-negativen Bakterium *E. coli* die höchsten Aktivierungsfaktoren (Topp, *et al.*, 2010). Die anti-SD-Sequenz trägt hier die Nukleotidabfolge 3'-AUUCCUCCACUAG-5' (Shine & Dalgarno, 1974) und ist im Kernbereich (unterstrichen) identisch zu der von *S. coelicolor*. Es ist zu mutmaßen, dass in *E. coli* weitere Faktoren, die zur Initiation der Translation beitragen, eine Expression durch die Schalter C und D in Gegenwart von Theophyllin gewährleisten.

Dass die Anzahl der zur anti-SD-Sequenz komplementären Nukleotide nicht allein entscheidend sein kann, zeigt ein Vergleich der Riboswitch A und B. Beide besitzen, zieht man die Wobble-Paarungen in Betracht, eine sehr ähnliche Komplementarität zur 16S rRNA. Riboswitch A zeigte jedoch eine etwa zehnfach höhere GusA-Expression bei einer Aktivierung durch 4 mM Theophyllin als B (siehe Abb. 47). Möglicherweise beeinflussen bei Riboswitch B die Nukleotide, welche die SD-Sequenz umgeben, die Erkennung durch die anti-SD-Sequenz.

Die schwache SD-Sequenz 5'-AAGG-3' von Riboswitch D wurde von der Gallivan-Gruppe für Gram-positive Bakterien optimiert, indem das Codon AGG angefügt wurde (= Riboswitch E, siehe Tab. 23). Da die Entfernung der SD-Sequenz zum Startcodon bei Gram-positiven Bakterien durchschnittlich geringer ist (Ma, *et al.*, 2002), wurde zusätzlich der Schalter E* entworfen. Hierzu wurden das UAA-Codon, das direkt auf die SD-Sequenz von Riboswitch D folgt, durch AGG ersetzt, wodurch der Abstand zum Startcodon um drei Nukleotide verkürzt wurde (siehe Tab. 23). Die beiden Riboswitch wiesen in Gram-positiven Bakterien tatsächlich die besten Schalteigenschaften auf. Riboswitch E zeigte in *Mycobacterium smegmatis* und *Streptococcus pyogenes* die höchsten Aktivierung der Genexpression mit einem Faktor von jeweils ca. 60 (Topp, *et al.*, 2010). In *S. coelicolor* können bei Riboswitch E acht Nukleotide der SD-Sequenz (5'-AAGGAGGU-3') vollständig mit der anti-SD-Sequenz paaren. Die SD-Sequenz von E* bildet nur sieben mögliche Paarungen aus (5'-AAGGAGG-3'). Im Vergleich zu Riboswitch E* kann die stärkere Komplementarität der SD-Sequenz von Riboswitch E zur anti-SD-Sequenz als Erklärung für die höhere Basalexpression in Abwesenheit von Theophyllin dienen. Es ist nachgewiesen, dass eine erhöhte SD/anti-SD-Komplementarität mit doppelsträngig vorliegenden Ribosomenbindestellen konkurrieren kann (de Smit & van Duin, 1994). Insgesamt zeichnete sich E* als am besten geeigneter Riboswitch in dieser Studie mit *S. coelicolor* aus, bedingt durch die niedrige Basalexpression in Verbindung mit der hohen

Reportergenexpression nach Theophyllinzugabe. Der Wirkmechanismus von Riboswitch E* wird in Abbildung 53 dargestellt. Dieser kann als ein posttranskriptionelles Abschalten („*silencing*“) bezeichnet werden. Es wird angenommen, dass die Promotoraktivität hierbei nicht beeinträchtigt wird und die Transkription fortwährend stattfindet.

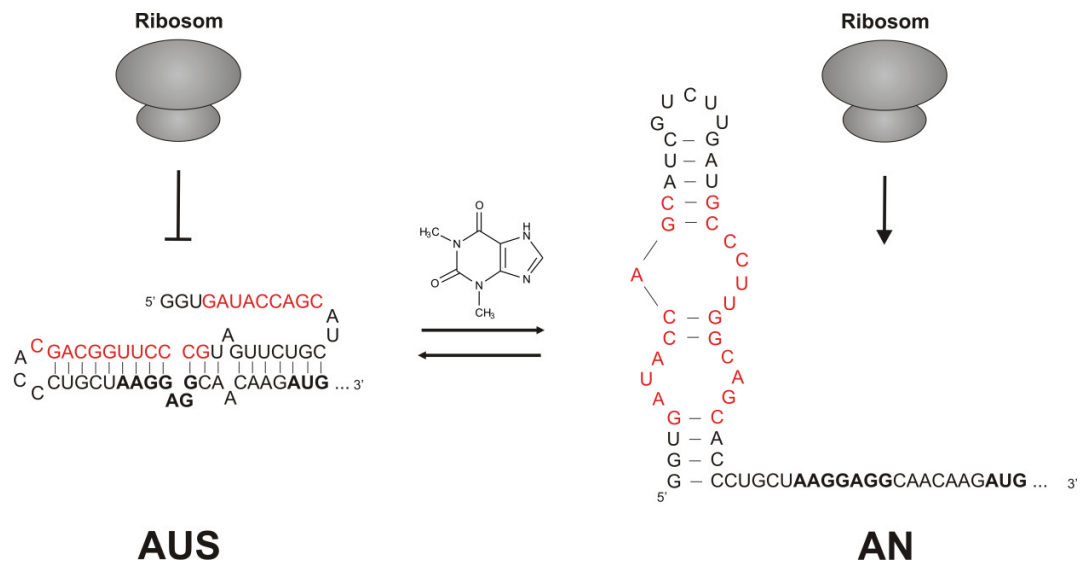


Abbildung 53: Riboswitch E* in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin. In Abwesenheit sind sowohl die SD-Sequenz 5'-AAGGAGG-3' und das Startcodon AUG in intramolekularen Strangpaarungen mit dem Theophyllinaptamer involviert. Erst in Anwesenheit von Theophyllin erfolgt eine Konformationsänderung im Riboswitch, wodurch die SD-Sequenz und das Startcodon für die Erkennung durch das Ribosom freigegeben werden. Nukleotide, die an der Bindung von Theophyllin beteiligt sind, sind rot markiert. Die SD-Sequenz sowie das Startcodon sind fett hinterlegt.

Die Integration des Riboswitches E* stromaufwärts des *gusA*-Gens führte für alle getesteten Promotoren zu einer nahezu vollständigen Reprimierung der Expression in Abwesenheit von Theophyllin (siehe Abb. 49). In Kombination mit dem Promotor SF14 wurde eine besonders niedrige Hintergrundexpression festgestellt, was in Verbindung mit der hohen GusA-Expression nach Zugabe von 4 mM Theophyllin zu einem 260-fachen Aktivierungsfaktor führte. Ein solch hoher Aktivierungsfaktor wurde bisher bei keinem Teststamm unter Verwendung dieser theophyllinabhängigen Riboswitches erreicht. Dies gilt ebenso für andere synthetische Riboswitches, die das Theophyllinaptamer als Sensordomäne verwendeten (beschrieben in Kapitel 2.4.2.2). Suess *et al.* konnten mit ihrem Theophyllin-Riboswitch, welcher auf dem *helix-slipping*-Mechanismus beruht, lediglich eine 8-fache Regulation eines β -Galaktosidasegens (kontrolliert durch den Repressor *xylR*) in *B. subtilis* erreichen (Suess, *et al.*, 2004). Auch die *de novo*-entwickelten transkriptionellen Riboswitches in *E. coli* zeigten nur eine 6,5-fache Zunahme der β -Galaktosidaseexpression durch Zugabe von Theophyllin (Wachsmuth, *et al.*, 2013). Interessanterweise liegt dieser Aktivierungsfaktor in der gleichen Größenordnung wie bei

dem zur Zeit am besten charakterisierten natürlichen „transkriptionellen Anschalter“ – dem *ydhL*-Riboswitch aus *B. subtilis*, der ein 10-faches Regulationsverhalten aufweist (Mandal & Breaker, 2004). Generell betrachtet können die im Gallivan-Labor entwickelten Schalter somit als die derzeit robustesten und am weitesten einsetzbaren synthetischen prokaryotischen Riboswitche angesehen werden.

5.2.2 Vergleich der theophyllinabhängigen Riboswitche mit konventionellen konditionalen Genexpressionssystemen in Streptomyceten

Nun stellt sich die Frage, inwiefern die getesteten Riboswitche hinsichtlich ihres Regulationsverhaltens und ihrer Anwendbarkeit eine Alternative zu konventionellen Genexpressionssystemen in Streptomyceten darstellen können. Hierzu erfolgt eine Gegenüberstellung ausgewählter Systeme in Tabelle 24. Wie bereits einleitend in Kapitel 2.6.3 dargelegt wurde, ist allen derzeit in Streptomyceten angewandten Induktionssystemen gemein, dass die Aktivierung der Genexpression durch induktorabhängige Proteinfaktoren vermittelt wird. Bei dem am häufigsten angewandten System, dem *ptipA*-Thiostrepton-System, wird der Promotor erst dann durch die RNA-Polymerase erkannt, wenn es zuvor zur Bindung eines Komplexes aus Thiostrepton und dem Aktivatorprotein TipA kommt (Murakami, *et al.*, 1989, Chiu, *et al.*, 2001). Ein Nachteil dieses Induktionssystems ist, dass das Aktivatorprotein TipA nicht in allen *Streptomyces*-Arten vorhanden ist und ggf. plasmidständig oder durch genomische Integration bereitgestellt werden muss (Holmes, *et al.*, 1993, Takano, *et al.*, 1995). Außerdem bedarf es der heterologen Expression des Thiostreptonresistenzgens *tsr*. Die Notwendigkeit zur Bereitstellung zusätzlicher Proteinfaktoren gilt ebenso für alle in der Tabelle aufgelisteten Repressor/Operatorsysteme. In diesem Zusammenhang zeigt sich ein großer Vorteil der dargestellten Riboswitche: Hierbei muss lediglich eine nur ~85 Nukleotide lange Sequenz zwischen einem Promotor und einem offenen Leserahmen kloniert werden.

Horbal *et al.* testeten in ihrer Studie einen Riboswitch in den zu *S. coelicolor* nah verwandten Arten *S. albus* und *S. lividans* (Horbal, *et al.*, 2014). Sie verwendeten dazu das im Hartig-Labor entwickelte Design, bei welchem die Zugabe von Theophyllin die Spaltung eines Hammerhead-Ribozyms induzierte und dadurch die Translationsinitiation ermöglichte (Wieland & Hartig, 2008). Im Vergleich zu *E. coli*, bei dem Wieland *et al.* eine 10-fache Induktion der GFP-Expression erreichen konnten, war die durch dieses „Aptazym“ vermittelte Aktivierung in den getesteten Streptomyceten jedoch äußerst gering und somit nicht anwendbar. Ebenso wenig konnte die Gruppe um Horbal in derselben Studie das für viele Bakterien angewandte LacI-Repressorsystem in *S. albus* und *S. lividans* implementieren.

Tabelle 24: Vergleich des Theophyllin-Riboswitchsystems mit ausgewählten Systemen zur konditionalen Genexpression in diversen *Streptomyces*-Arten.

System	Induktor (Preis pro 100 g) ^a	Benötigte Faktoren	Organismen	Aktivierungsfaktoren (Reportersystem)	Dosisabhängigkeit/ Induktorkonzentration
Theophyllin-Riboswitch vorliegende Studie	Theophyllin (43 €)	keine zusätzlichen Proteinfaktoren benötigt	<i>S. coelicolor</i>	≥260x (SF14-E*) (GusA-Expression)	ja Maximum: 4 mM Theophyllin
<i>ptpA</i>-Thiostrepton-System (Murakami, <i>et al.</i> , 1989)	Thiostrepton (20.400 €)	TipA-Aktivatorprotein <i>tsr</i> -Resistenzgen	<i>S. lividans</i> (Anwendbarkeit in <i>S. coelicolor</i> gezeigt: Myronovskyi, <i>et al.</i> , 2011)	200x (Kanamycinresistenz)	n.d. ^c eingesetzt: 30 µM Thiostrepton
<i>P_{nitA}</i>-NitR-System (Herai, <i>et al.</i> , 2004)	ε-Caprolactam (4 €)	NitR-Repressor	<i>S. coelicolor</i> , <i>S. avermitillis</i> , <i>S. griseus</i> , <i>S. lividans</i>	überexprimiertes Protein = 40% der löslichen Fraktion	ja Maximum: ~ 8 mM ε-Caprolactam
TetR/<i>tetO</i>-System (Rodriguez-Garcia, <i>et al.</i> , 2005)	Anhydrotetrazyklin (220.000 €)	TetR-Repressor	<i>S. coelicolor</i> , <i>S.</i> <i>ambofaciens</i> , <i>S. avermitillis</i> , <i>S. lividans</i>	270x (Luciferaseexpression)	ja Maximum: ~4 µM Anhydrotetrazyklin
RolR-Resorcin-System (Horbal, <i>et al.</i> , 2014)	Resorcin (71 €)	RolR-Repressor	<i>S. albus</i>	33x (GusA-Expression)	ja Maximum: 40 µM Resorcin
CymR-Cuminsäure-System (Horbal, <i>et al.</i> , 2014)	Cuminsäure (680 €)	CymR-Repressor	<i>S. albus</i> , <i>S. lividans</i> , <i>Saccharopolyspora</i> <i>erythraea</i>	45x (GusA-Expression)	ja Maximum: 30–100 µM Cuminsäure
LacI-Repressorsystem (Horbal, <i>et al.</i> , 2014)	IPTG (5.320 €)	LacI-Repressor	<i>S. albus</i> , <i>S. lividans</i> ,	nicht funktional	-
Theophyllinabhängiges Hammerhead-Ribozym^b (Horbal, <i>et al.</i> , 2014)	Theophyllin (43 €)	keine zusätzlichen Proteinfaktoren benötigt	<i>S. albus</i> , <i>S. lividans</i> , <i>Actinoplanes</i> <i>teichomyceticus</i>	sehr schwache Induktion, nicht nutzbar	-

^a Preisauskünfte auf <http://www.sigmaaldrich.com> am 03.06.2015 um 8:00 Uhr.

^b Adaptiert von (Wieland & Hartig, 2008).

^c Wurde in der Studie nicht bestimmt. Ein dosisabhängiges Verhalten gilt jedoch als wahrscheinlich.

Ein Vergleich der in Tabelle 24 dargestellten Aktivierungsfaktoren deutet an, dass die synthetischen Riboswitche eine gleichwertige Kontrolle über die Genexpression wie die proteinbasierten Systeme ermöglichen. Insbesondere die Studien von Horbal *et al.* lassen eine direkte Gegenüberstellung der Systeme zu, da sie sich dem GusA-Reportersystem in *S. albus* und *S. lividans* bedienten. Hier wurden durch das RolR- bzw. CymR-System Aktivierungsfaktoren von 33- bzw. 45-fach erhalten, was in etwa vergleichbar zu den mit Riboswitch E* erreichten Faktoren in *S. coelicolor* ist (in Kombination mit *galP2* und *ermEp1*, siehe Abb. 48). Es ist denkbar, dass mit der Kombination aus dem sehr starken Promotor SF14 und E* eine noch höhere Aktivierung für die GusA-Expression in *S. albus* und *S. lividans* erhalten werden könnte, wie bei *S. coelicolor*. Eine Testung der Riboswitche in verwandten Streptomyceten steht gegenwärtig noch aus.

Durch das *ptipA*-Thiostrepton- und das TetR/*tetO*-System wurden für die jeweiligen Reportergene Aktivierungsfaktoren ≥ 200 erreicht, was mit der Regulationsfähigkeit des hier getesteten SF14-E*-Konstrukts vergleichbar ist. Im Falle des *ptipA*-System wurde jedoch in *S. lividans* bemerkt, dass es unter bestimmten osmotischen Zuständen zu einer verstärkten Hintergrundexpression kam, was die Regulationsfähigkeit erheblich minderte (Ali, *et al.*, 2002). Hingegen konnte für das Riboswitchsystem bisher in keiner Studie eine Einschränkung des Regulationsverhaltens durch bestimmte Medienkomponenten beobachtet werden. Auch in dieser Arbeit war Riboswitch E* auf allen getesteten Medien funktional (siehe Abb. 44).

Für alle in Tabelle 24 aufgelisteten funktionalen Expressionssysteme wurde eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen. Die eingesetzte Induktorkonzentration lag dabei in den meisten Fällen im mikromolaren Bereich und damit deutlich niedriger als beim Riboswitchsystem, bei welchem 2–4 mM Theophyllin benötigt wurden. Die Gründe dafür könnten in der Aufnahme, der Ausschleusung oder der Verstoffwechselung von Theophyllin zu suchen sein, wofür keine Studien in Streptomyceten vorliegen. Eine Untersuchung in *E. coli* zeigte jedoch, dass nur 0,07% des extrazellulär zugegebenen Theophyllins inkorporiert wurden (Koch, 1956). Dies könnte auch eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem K_d -Wert des Theophyllinaptamers (ca. 100 nM) und der benötigten Induktorkonzentration in *S. coelicolor* sein. Ein Nachteil dieser hohen benötigten Konzentration ist zudem, dass Theophyllin einen negativen Einfluss auf das Kulturwachstum von *S. coelicolor* M145 zeigte. Eine signifikante Verzögerung dieses Wachstums war dabei ab einer Konzentration von 2 mM auf Festnährböden (SM-Nährmedium) und ab 4 mM bei TSB-Flüssigkulturen (siehe Abb. 45) zu beobachten. Dennoch konnte Theophyllin in niedrigeren Konzentrationen als Induktor eingesetzt werden, ohne dass phänotypische Änderungen im Vergleich zum Wachstum auf nicht supplementierten Nährmedien beobachtet wurden.

Ein nicht zu vernachlässigender Faktor bei der Gegenüberstellung der konditionalen Genexpressionssysteme ist der Preis des Induktors, insbesondere wenn eine Kultivierung im großen Maßstab (z.B. Fermenter) in Betracht gezogen wird. Hierfür sind die

antibiotikainduzierten Systeme eher ungeeignet. Eine preiswertere Alternative stellen hingegen Resorcin und Theophyllin dar. Letzteres wird nur noch durch das äußerst günstige ϵ -Caprolactam übertroffen (vgl. Tab. 24).

Der größte Vorzug der theophyllinabhängigen Riboswitche ist, dass sie mit unterschiedlich starken Promotoren kombiniert werden können, wodurch die Expressionsstärke nach individuellen Anforderungen angepasst werden kann. Überdies erlauben die dosisabhängige sowie zeitliche Regulierbarkeit zusätzliche Kontrollebenen zur Feineinstellung der Expression. Außerdem wurde eine hohe Spezifität des Systems nachgewiesen, da es exklusiv durch Theophyllin und nicht durch strukturell nahverwandte Moleküle, wie Koffein, reguliert wurde.

In den folgenden Kapiteln soll ein Ausblick gegeben werden, welche weiteren Einsatzmöglichkeiten diese Riboswitche für die Genexpression in Streptomyceten haben können.

5.2.3 Anwendungsmöglichkeiten der synthetischen Riboswitche in Streptomyceten

5.2.3.1 Wahl des Promotors

Es ist notwendig, einen hohen Kontrollbereich über die Expressionsstärke von Proteinen ausüben zu können. In dieser Studie wurde sich dazu der Anwendung drei unterschiedlich starker Promotoren bedient: dem schwachen *galP2* (Fornwald, *et al.*, 1987), dem mittelstarken *ermEp1* (Bibb, *et al.*, 1985) und dem sehr starken SF14-Promotor (Labes, *et al.*, 1997). Es soll darauf hingewiesen werden, dass diese allesamt konstitutiven Promotoren aus nahe verwandten Streptomyceten entstammen (*S. lividans*, *S. erythraeus* bzw. im Fall von SF14 aus einem Phagen von *S. ghanaensis*). Die Anwendbarkeit dieser Promotoren zur Genexpression in *S. coelicolor* wurde in diversen anderen Studien bereits belegt (Westpheling & Brawner, 1989, Rodriguez-Garcia, *et al.*, 2005, Vockenhuber & Suess, 2012).

Die Kombinierbarkeit aller Riboswitche mit den drei getesteten Promotoren wurde in Abbildung 43 demonstriert. Es wird angenommen, dass die Riboswitche frei mit weiteren natürlichen oder heterologen Promotoren in *S. coelicolor* kombiniert werden können, wodurch die erforderliche Expressionsstärke eingestellt werden kann. Dabei gilt zu beachten, dass die ursprüngliche Expressionsstärke des Promotors nach Integration eines Riboswitches in einigen Fällen gegebenenfalls nicht wiederhergestellt werden kann. In dieser Studie wurde eine theophyllinbedingte Aktivierung der *gusA*-Genexpression auf dasselbe Niveau des jeweiligen Konstruktes ohne Riboswitch nur für den schwachen Promotors *galP2*, nicht jedoch für die starken Promotoren *ermEp1* und SF14 erreicht. Obwohl keine Information über die Kopienzahl der jeweiligen *gusA*-Transkripte zur Verfügung standen, darf davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der Theophyllinmoleküle die größere Anzahl der mRNA-Moleküle nicht titrieren konnte. Dieses Ungleichgewicht wurde besonders beim sehr starken Promotor SF14 deutlich.

Es ist denkbar, dass eine Erhöhung der Theophyllinkonzentration die Reporterexpression in *S. coelicolor* weiter aktivieren würde, was jedoch aufgrund toxischer Nebeneffekte nicht möglich ist. Hingegen konnte im nicht toxischen Konzentrationsbereich zwischen 0 und 4 mM ein direkter, proportionaler Zusammenhang zwischen der Theophyllinkonzentration und GusA-Expression gezeigt werden (Konstrukt pGusT-ermE-E*; siehe Abb. 50). Das Riboswitchsystem besitzt somit einen dosisabhängigen Charakter. Zur exakten Einstellung der gewünschten Expressionsstärke eines Gens kann es daher vonnöten sein, die Riboswitches in Kombination mit verschiedenen starken Promotoren bei unterschiedlichen Theophyllinkonzentrationen zu testen.

5.2.3.2 Fähigkeit zur Induktion/Repression der Genexpression

Insbesondere für Streptomyceten ist eine exakte zeitliche Koordinierung der Genexpression unverzichtbar, betrachtet man sich ihren komplexen Lebenszyklus mit all den einhergehenden morphologischen und physiologischen Differenzierungsprozessen. Zu Forschungszwecken sowie für biotechnologische Anwendungen ist es von großer Wichtigkeit, dass die Expression einzelner oder mehrerer Gene zu bestimmten Zeitpunkten angeschaltet oder herunterreguliert werden kann. Beispielsweise führen einige Proteine zu lethalen Phänotypen, weshalb sie erst ab einer bestimmten Wachstumsphase induziert werden dürfen. Andererseits kann für bestimmte Zwecke ein Gen-Knockdown erforderlich sein. In diesen beiden Fällen ist ein leicht steuerbares Schaltelement mit schnellen und vorhersagbaren Kinetiken notwendig. Im Hinblick auf diese Anforderungen wurde für Riboswitch E* getestet, ob und wie schnell er in der Lage ist, die Genexpression durch Theophyllinzugabe zu induzieren bzw. durch Entfernen dessen wieder zu reprimieren. Die Induktion/Repression erfolgte dabei während der exponentiellen Wuchsphase, genauer gesagt nach einer 48-stündigen Kultivierung. Anhand der dargestellten Ergebnisse in Abbildung 51 und Abbildung 52 lässt sich zusammenfassen, dass das Riboswitchsystem eine schnelle und reversible Induktion bzw. Repression der β -Glucuronidaseexpression zulässt. Die Kinetiken sind hierbei von der mRNA- und Proteinstabilität abhängig und können sich vermutlich bei verschiedenen Genen stark unterscheiden. Zudem wird davon ausgegangen, dass die maximale Induktions- bzw. Repressionsrate wachstumsphasenabhängig ist und die Effekte je kleiner ausfallen, desto weiter das Kulturwachstum vorangeschritten ist. Die Verdopplungszeit beträgt bei *S. coelicolor* ca. 2,2 h in SM-Medium und verlangsamt sich bei Erreichen der stationären Phase (Kieser, *et al.*, 2000).

5.2.3.3 Wahl des Riboswitches

Die Wahl des verwendeten Riboswitches sollte sich nach dem Anwendungszweck richten. Riboswitch A zeigte die effizienteste Repression der Genexpression, welche mit dem größten Aktivierungsfaktor nach Ligandenzugabe einherging. Dieser Riboswitch ist vermutlich am besten für Anwendungen mit Multicopy-Plasmiden geeignet, bzw. dann, wenn eine strenge Expressionskontrolle von größerer Wichtigkeit als eine hohe Proteinexpression ist. In dem hier

dargestellten Testsystem mit nur einer Kopie pro Genom zeigte Riboswitch E* den höchsten Anstieg der Proteinexpression, verbunden mit einer niedrigen Hintergrundexpression in Abwesenheit von Theophyllin. Somit dürfte Riboswitch E* für die meisten Anwendungen, bei denen eine hoher Ertrag des Genproduktes entscheidend ist, gewählt werden.

Mit dem Einsatz von Riboswitch E* zur konditionalen Kontrolle des endogenen *dagA*-Gens konnte Michael Vockenhuber die Modularität und Anwendbarkeit des dargestellten Systems unterstreichen (Rudolph, *et al.*, 2013). Neben dieser Anwendung wurden und werden die Riboswitche aktuell auch in anderen Laboren zur konditionalen Genexpression in Streptomycceten verwendet. Ein Beispiel ist die Regulation des Regulatorproteins AdpA in *S. coelicolor* mit Riboswitch E* durch die Gruppe um K. Yang (Wang, *et al.*, 2014).

All die in dieser Studie dargelegten Experimente und Beispiele bekräftigen die Annahme, dass die entwickelten Riboswitchsysteme zukünftig als einfach zu implementierende und gleichzeitig robuste Alternativen zu konventionellen Expressionssystemen in Streptomycceten genutzt werden können.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

A	Adenin	k_{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	MQ-H ₂ O	Reinstwasser durch MilliQ-Anlage
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)	mRNA	<i>messenger</i> RNA
C	Cytosin oder Kohlenstoff	MW	Molekulargewicht
cDNA	komplementäre DNA	N	Stickstoff o. variable Base
DMF	Dimethylformamid	ncRNA	nicht kodierende RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid	NTPs	Nukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>ori</i>	Replikationsursprung
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate	p.a.	per analysis
ds	doppelsträngig	PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
DTT	Dithiothreitol	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. "und andere")	PEG	Polyethylenglykol
EtOH	Ethanol	PNK	Polynukleotidkinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	rev	rückwärts (reverse)
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)	RNA	Ribonukleinsäure
G	Guanin	rRNA	Ribosomale RNA
GFP	grünfluoreszierendes Protein	RT	Raumtemperatur
IR	Infrarotstrahlung	RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie	SAM	S-Adenosylmethionin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	SD-Sequenz	Shine-Dalgarno-Sequenz
K_a	Assoziationskonstante		
K_d	Dissoziationskonstante		

SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung	tRNA	transfer RNA
		U	Uracil
sRNA	kleine, nicht kodierende RNA	UTP	Uridintriphosphat
ss	einzelsträngig	UTR	Untranslatierter Bereich
T	Thymin	UV	Ultraviolette Strahlung
TAE	Tris-Acetat-EDTA	VIS	Sichtbares Spektrum
TBE	Tris-Borat-EDTA	Vol.	Volumen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure (Cyclohexylammoniumsalz)
TK-Mix	Transkriptionsmix		

6.2 Einheiten und Dimensionen

Einheiten		OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
% (v/v)	% (Volumen/Volumen)	rpm	Umdrehungen pro Minute
% (w/v)	% (Gewicht/Volumen)	s	Sekunde
°C	Grad Celsius	T	Temperatur
A	Ampere	U	Unit
A ₄₁₅	Absorption bei 415 nm	V	Volt
cal	Kalorien	ΔG	Gibbs-Energie
bp	Basenpaare	ΔH	Änderung der Enthalpie
g	Gravitationskonstante/Gramm	ΔS	Änderung der Entropie
GU	Gus Unit	Dimensionen	
h	Stunde	M	Mega (10 ⁶)
l	Liter	k	kilo (10 ³)
M	Molar	m	milli (10 ⁻³)
m	Meter	μ	micro (10 ⁻⁶)
Mb	Megabasenpaare	n	nano (10 ⁻⁹)
min	Minute	p	pico (10 ⁻¹²)
n	Stöchiometrie	f	femto (10 ⁻¹⁵)
nt	Nukleotide		

6.3 Zusätzliche Tabellen

Für die im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Diagramme, bei denen eine Normierung erfolgte, werden die der Berechnung zugrundeliegenden Messwerte folgend aufgelistet. Zudem wird in Tabelle 26 das detaillierte radioaktive Profil der *in vitro*-Selektion gegen TH-CA gezeigt.

Tabelle 25: Rohdaten der Bindungstests des radioaktiv markierten Aptamers F10 an unterschiedlich bestrahlte TH72-Biotin-Beads (siehe Abb. 21).

		counts			Anteil Eluat an Gesamtradioaktivität ± SD [%]
		Messung (1)	Messung (2)	Mittelwert ± SD	
unbestrahlt	Überstand	10096	11045	10571 ± 475	6,5 ± 0,2
	Wasch 1	417	313	365 ± 52	
	Wasch 2	32	34	33 ± 1	
	Elution	742	786	764 ± 22	
	Beads	48	104	76 ± 28	
UV	Überstand	9567	9389	9478 ± 89	1,5 ± 0,3
	Wasch 1	371	474	423 ± 52	
	Wasch 2	58	51	55 ± 4	
	Elution	181	120	151 ± 31	
	Beads	13	18	16 ± 3	
UV + VIS	Überstand	11913	12313	12113 ± 200	5,6 ± 0,1
	Wasch 1	231	210	221 ± 11	
	Wasch 2	86	49	68 ± 19	
	Elution	725	760	743 ± 18	
	Beads	4	62	33 ± 29	

Tabelle 26: Übersicht über das radioaktive Profil der *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen TH-CA durch säulenbasierte Affinitätschromatographie (siehe Abb. 24 und Tab. 17).

	counts								
	Runde 1	Runde 2	Runde 3	Runde 4	Runde 5	Runde 6	Runde 7	Runde 8	Runde 9
Vorsäule	64	183	150	-	-	-	-	-	-
Durchfl. 1	806	336	151	4281	2742	3951	4180	2105	2250
Durchfl. 2	4507	4102	2151	-	-	-	-	-	-
Durchfl. 3	3955	6439	3651	-	-	-	-	-	-
W1	857	1679	1043	6754	6240	6070	7647	4199	1781
W2	96	109	160	497	1542	1249	1154	778	917
W3	9	35	27	87	372	245	160	158	248
W4	12	28	12	45	140	67	103	95	138
W5	10	13	18	31	50	28	83	111	100
W6	21	15	13	21	30	12	81	105	113
W7	14	12	13	17	39	22	90	82	107
W8	13	17	9	30	22	10	76	105	104
W9	18	13	6	47	47	14	77	79	93
W10	12	20	14	29	18	12	53	90	129
W11	-	-	-	-	-	-	-	88	90
W12	-	-	-	-	-	-	-	78	83
W13	-	-	-	-	-	-	-	73	82
W14	-	-	-	-	-	-	-	75	75
W15	-	-	-	-	-	-	-	85	89
W16	-	-	-	-	-	-	-	72	95
W17	-	-	-	-	-	-	-	84	70
W18	-	-	-	-	-	-	-	74	90
W19	-	-	-	-	-	-	-	76	79
W20	-	-	-	-	-	-	-	61	96
W21	-	-	-	-	-	-	-	69	84
W22	-	-	-	-	-	-	-	66	71
W23	-	-	-	-	-	-	-	45	67
W24	-	-	-	-	-	-	-	77	77
W25	-	-	-	-	-	-	-	60	80
Prälu1	-	-	-	-	-	-	-	349	486
Prälu2	-	-	-	-	-	-	-	580	649
Prälu3	-	-	-	-	-	-	-	-	304
E1	6	65	20	74	100	14	164	312	275
E2	13	35	19	55	168	33	303	171	147
E3	7	12	12	14	38	20	210	152	117
E4	12	13	13	10	27	12	111	140	87
E5	-	-	-	-	-	13	97	-	-
E6	-	-	-	-	-	14	81	-	-
Säule	15	18	19	11	105	65	340	289	90
Gesamt	10447	13144	7501	12003	11680	11851	15010	10983	9363
Anteil Eluat an Gesamtradioaktivität [%]	0,4	1,0	0,9	1,2	2,9	0,9	6,4	7,1	6,7

Durchfl. = Durchfluss; W = Waschfraktion; Prälu = Präelutionsfraktion; E = Elutionsfraktion. Der Anteil der eluierten RNA errechnete sich aus der Summe der counts der Elutionsfraktionen (ohne Präeluat) dividiert durch die gesamten eingesetzten counts.

Tabelle 27: Daten zu den Bindungsstudien der Vollängen- und verkürzten Aptamere an mit TH-CA-Amino derivatisierte Säulen (siehe Abb. 29).

	Anteil Eluat an Gesamtradioaktivität [%]		
	Messung (1)	Messung (2)	Mittelwert ± SD
34_Voll	13,2	11,7	12,4 ± 0,8
34_V1	4,4	4,4	4,4 ± 0,0
34_V3	1,8	2,0	1,9 ± 0,1
34_V3	2,0	2,2	2,1 ± 0,1
42_Voll	37,4	41,2	39,3 ± 1,9
42_V1	31,9	34,5	33,2 ± 1,3
45_Voll	5,9	5,9	5,9 ± 0
45_V1	2,0	3,0	2,5 ± 0,5
45_V2	2,4	5,0	3,7 ± 1,3
48_Voll	17,8	22,2	20,0 ± 2,2
48_V1	3,1	4,7	3,9 ± 0,8
48_V2	3,1	2,6	2,8 ± 0,3
48_V3	5,2	3,8	4,5 ± 0,7
64_Voll	29,4	32,1	30,8 ± 1,3
64_V1	2,1	2,2	2,2 ± 0,1
64_V2	1,5	2,4	1,9 ± 0,4
64_V3	2,2	2,6	2,4 ± 0,2

Tabelle 28: Rohdaten der Analyse des Elutionsvermögens der RNA 42_V1 durch unterschiedlich belichtete TH-CA-Lösungen von mit TH-CA-Amino derivatisierten Säulen (siehe Abb. 32).

	counts						
	unbestr. *(1)	unbestr. (2)	UV (1)	UV (2)	UV+VIS (1)	UV+VIS (2)	Puffer
Durchfl. 1	1129	1174	1407	1006	1606	1211	1485
W1	1509	1365	1268	1290	1399	1319	1134
W2	96	87	340	334	254	292	313
W3	47	30	76	92	48	92	87
W4	33	22	35	45	49	23	92
W5	35	26	38	38	39	59	29
E1	62	91	26	25	146	96	40
E2	121	76	36	24	158	79	49
E3	163	84	39	33	153	85	25
E4	114	87	52	19	123	78	42
E5	100	87	61	35	107	66	28
E6	98	56	58	40	85	63	47
Säule	211	119	217	161	126	102	121
Gesamt	3718	3304	3653	3142	4293	3565	3492
Anteil Eluat an Gesamtradio- aktivität [%]	17,7	14,6	7,4	5,6	18,0	13,1	6,6
Mittelwert ± SD	16,1 ± 1,6		6,5 ± 0,9		15,5 ± 2,4		6,6 ± 0

*unbestr. = unbestrahlt. (1) und (2) = Messung 1 und 2.

Durchfl. = Durchfluss; W = Waschfraktion; E = Elutionsfraktion. Der Anteil der eluierten RNA errechnete sich aus der Summe der counts der Elutionsfraktionen dividiert durch die gesamten eingesetzten counts.

Tabelle 29: Rohdaten der Messung der Fluoreszenz von Kulturen von *S. cerevisiae* RS453, transformiert mit pWHE601, pWHEMMR-42V1, pWHEMMR-42V2, pWHEMMR-42DbI oder pWHEMMR- 42loop (siehe Abb. 41).

	Fluoreszenz/OD ₆₀₀								
	ohne Azo. (1)	ohne Azo. (2)	Mittelw. ± SD ohne Azo.	100 µM TH-CA (1)	100 µM TH-CA (2)	Mittelw. ± SD 100 µM TH-CA	100 µM TH-CA-Amino (1)	100 µM TH-CA-Amino (2)	Mittelw. ± SD 100 µM TH-CA-Amino
pWHE601	25674	24938	25305 ± 368	24774	23869	24321 ± 452	25606	24235	24920 ± 686
MMR42V1	255	382	318 ± 64	649	610	629 ± 20	606	728	667 ± 61
MMR42V2	400	388	394 ± 6	606	619	612 ± 7	428	647	537 ± 109
MMR42DbI	288	368	327 ± 40	444	599	521 ± 77	459	700	579 ± 121
MMR42loop	3624	3641	3632 ± 9	3576	3517	3546 ± 29	3582	3780	3681 ± 99

(1) und (2) = Messungen 1 und 2.

7 Literatur

- [1] Ali N, Herron PR, Evans MC & Dyson PJ (2002) Osmotic regulation of the *Streptomyces lividans* thiostrepton-inducible promoter, *ptipA*. *Microbiology* **148**: 381-390.
- [2] Amaya-González S, de-los-Santos-Alvarez N, Miranda-Ordieres AJ & Lobo-Castanón MJ (2013) Aptamer-based analysis: a promising alternative for food safety control. *Sensors (Basel)* **13**: 16292-16311.
- [3] Ameres SL, Druempel L, Pfeleiderer K, Schmidt A, Hillen W & Berens C (2005) Inducible DNA-loop formation blocks transcriptional activation by an SV40 enhancer. *EMBO J* **24**: 358-367.
- [4] Andrews PR, Craik DJ & Martin JL (1984) Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J Med Chem* **27**: 1648-1657.
- [5] Anné J, Maldonado B, Van Impe J, Van Mellaert L & Bernaerts K (2012) Recombinant protein production and streptomycetes. *J Biotechnol* **158**: 159-167.
- [6] Antao VP, Lai SY & Tinoco I, Jr. (1991) A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins. *Nucleic Acids Res* **19**: 5901-5905.
- [7] Asanuma H, Ito T, Yoshida T, Liang X & Komiyama M (1999) Photoregulation of the Formation and Dissociation of a DNA Duplex by Using the cis-trans Isomerization of Azobenzene. *Angew Chem Int Ed Engl* **38**: 2393-2395.
- [8] Babitzke P & Gollnick P (2001) Posttranscription initiation control of tryptophan metabolism in *Bacillus subtilis* by the trp RNA-binding attenuation protein (TRAP), anti-TRAP, and RNA structure. *J Bacteriol* **183**: 5795-5802.
- [9] Baylis HA & Bibb MJ (1987) The nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nucleic Acids Res* **15**: 7176.
- [10] Beharry AA & Woolley GA (2011) Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem Soc Rev* **40**: 4422-4437.
- [11] Beilstein K, Wittmann A, Grez M & Suess B (2014) Conditional Control of Mammalian Gene Expression by Tetracycline-Dependent Hammerhead Ribozymes. *ACS Synth Biol*.
- [12] Beisel CL & Smolke CD (2009) Design principles for riboswitch function. *PLoS Comput Biol* **5**: e1000363.
- [13] Benner SA & Sismour AM (2005) Synthetic biology. *Nat Rev Genet* **6**: 533-543.
- [14] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- [15] Bérdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **58**: 1-26.
- [16] Berens C & Suess B (2014) Riboswitch engineering - making the all-important second and third steps. *Curr Opin Biotechnol* **31**: 10-15.
- [17] Berens C, Thain A & Schroeder R (2001) A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem* **9**: 2549-2556.

- [18] Berens C, Groher F & Süss B (2015) RNA aptamers as genetic control devices: the potential of riboswitches as synthetic elements for regulating gene expression. *Biotechnol J* **10**: 246-257.
- [19] Bibb MJ (2013) Understanding and manipulating antibiotic production in actinomycetes. *Biochem Soc Trans* **41**: 1355-1364.
- [20] Bibb MJ, Janssen GR & Ward JM (1985) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **38**: 215-226.
- [21] Biroccio A, Hamm J, Incitti I, De Francesco R & Tomei L (2002) Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **76**: 3688-3696.
- [22] Borovok I, Gorovitz B, Schreiber R, Aharonowitz Y & Cohen G (2006) Coenzyme B12 controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase *nrdAB* operon via a riboswitch mechanism. *J Bacteriol* **188**: 2512-2520.
- [23] Boulègue C, Löweneck M, Renner C & Moroder L (2007) Redox potential of azobenzene as an amino acid residue in peptides. *Chembiochem* **8**: 591-594.
- [24] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- [25] Breaker RR (2012) Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.
- [26] Brieke C, Rohrbach F, Gottschalk A, Mayer G & Heckel A (2012) Light-controlled tools. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**: 8446-8476.
- [27] Burgstaller P & Famulok M (1994) Isolation of RNA Aptamers for Biological Cofactors by *In Vitro* Selection. *Angewandte Chemie International Edition in English* **33**: 1084-1087.
- [28] Burke DH, Hoffman DC, Brown A, Hansen M, Pardi A & Gold L (1997) RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol. *Chem Biol* **4**: 833-843.
- [29] Butcher SE & Pyle AM (2011) The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks. *Acc Chem Res* **44**: 1302-1311.
- [30] Caron MP, Bastet L, Lussier A, Simoneau-Roy M, Masse E & Lafontaine DA (2012) Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E3444-3453.
- [31] Carothers JM, Oestreich SC, Davis JH & Szostak JW (2004) Informational complexity and functional activity of RNA structures. *J Am Chem Soc* **126**: 5130-5137.
- [32] Carothers JM, Goler JA, Kapoor Y, Lara L & Keasling JD (2010) Selecting RNA aptamers for synthetic biology: investigating magnesium dependence and predicting binding affinity. *Nucleic Acids Res* **38**: 2736-2747.
- [33] Cech TR & Steitz JA (2014) The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* **157**: 77-94.
- [34] Ceres P, Garst AD, Marcano-Velazquez JG & Batey RT (2013) Modularity of select riboswitch expression platforms enables facile engineering of novel genetic regulatory devices. *ACS Synth Biol* **2**: 463-472.
- [35] Chater KF (1984) *Morphological and Physiological Differentiation in Streptomyces*. Cold Spring Harbor Monograph Archive.

- [36] Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T & Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 171-198.
- [37] Chiu ML, Viollier PH, Katoh T, Ramsden JJ & Thompson CJ (2001) Ligand-induced changes in the *Streptomyces lividans* TipAL protein imply an alternative mechanism of transcriptional activation for MerR-like proteins. *Biochemistry* **40**: 12950-12958.
- [38] Cho EJ, Lee JW & Ellington AD (2009) Applications of aptamers as sensors. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **2**: 241-264.
- [39] Ciesiolka J, Gorski J & Yarus M (1995) Selection of an RNA domain that binds Zn^{2+} . *RNA* **1**: 538-550.
- [40] Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L & Wosten HA (2006) Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* **14**: 313-319.
- [41] Cox KL & Baltz RH (1984) Restriction of bacteriophage plaque formation in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* **159**: 499-504.
- [42] Davis JH & Szostak JW (2002) Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11616-11621.
- [43] de Smit MH & van Duin J (1994) Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J Mol Biol* **235**: 173-184.
- [44] Desai SK & Gallivan JP (2004) Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J Am Chem Soc* **126**: 13247-13254.
- [45] Doherty EA & Doudna JA (2000) Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem* **69**: 597-615.
- [46] Doull JL & Vining LC (1989) Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* **53**: 265-268.
- [47] Dower WJ, Miller JF & Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- [48] Dürr H (2004) IUPAC-Empfehlungen: Organische Photochromie. *Angewandte Chemie* **116**: 3404-3418.
- [49] Ellington AD & Szostak JW (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818-822.
- [50] Endo K & Nakamura Y (2010) A binary Cy3 aptamer probe composed of folded modules. *Anal Biochem* **400**: 103-109.
- [51] Famulok M (1994) Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 1698–1706.
- [52] Famulok M & Szostak JW (1992) Stereospecific recognition of tryptophan agarose by *in vitro* selected RNA. *J Am Chem Soc* **114**: 3990-3991.
- [53] Famulok MSJ (1992) Stereospecific recognition of tryptophan agarose by *in vitro* selected RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 3990–3991.
- [54] Fischer J (1996) Entwicklung eines regulierbaren Expressionssystems zur effizienten Synthese rekombinanter Proteine in *Streptomyces lividans*. *Doctoral Dissertation, University of Stuttgart*.

- [55] Flett F, Mersinias V & Smith CP (1997) High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* **155**: 223-229.
- [56] Fohrer J, Hennig M & Carlomagno T (2006) Influence of the 2'-hydroxyl group conformation on the stability of A-form helices in RNA. *J Mol Biol* **356**: 280-287.
- [57] Fornwald JA, Schmidt FJ, Adams CW, Rosenberg M & Brawner ME (1987) Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2130-2134.
- [58] Fuchs RT, Grundy FJ & Henkin TM (2006) The S_{MK} box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 226-233.
- [59] Gebhardt K, Shokraei A, Babaie E & Lindqvist BH (2000) RNA aptamers to S-adenosylhomocysteine: kinetic properties, divalent cation dependency, and comparison with anti-S-adenosylhomocysteine antibody. *Biochemistry* **39**: 7255-7265.
- [60] Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A & Famulok M (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* **24**: 1029-1036.
- [61] Gevertz J, Gan HH & Schlick T (2005) *In vitro* RNA random pools are not structurally diverse: a computational analysis. *RNA* **11**: 853-863.
- [62] Gilbert SD, Stoddard CD, Wise SJ & Batey RT (2006) Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *J Mol Biol* **359**: 754-768.
- [63] Green NM (1975) Avidin. *Adv Protein Chem* **29**: 85-133.
- [64] Groher F (2015) Kontrolle des prä-mRNA Spleißens durch synthetische Riboswitche. *Dissertation, Technische Universität Darmstadt*.
- [65] Groher F & Suess B (2014) Synthetic riboswitches - A tool comes of age. *Biochim Biophys Acta*.
- [66] Grozio A, Gonzalez VM, Millo E, *et al.* (2013) Selection and characterization of single stranded DNA aptamers for the hormone abscisic Acid. *Nucleic Acid Ther* **23**: 322-331.
- [67] Grundy FJ & Henkin TM (2003) The T box and S box transcription termination control systems. *Front Biosci* **8**: d20-31.
- [68] Halder S & Bhattacharyya D (2013) RNA structure and dynamics: a base pairing perspective. *Prog Biophys Mol Biol* **113**: 264-283.
- [69] Harvey I, Garneau P & Pelletier J (2002) Inhibition of translation by RNA-small molecule interactions. *RNA* **8**: 452-463.
- [70] Hayashi G, Hagihara M & Nakatani K (2009) RNA aptamers that reversibly bind photoresponsive azobenzene-containing peptides. *Chemistry* **15**: 424-432.
- [71] Hayashi G, Hagihara M, Dohno C & Nakatani K (2007) Reversible regulation of binding between a photoresponsive peptide and its RNA aptamer. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 93-94.
- [72] He L & Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* **5**: 522-531.
- [73] Heinemann M & Panke S (2006) Synthetic biology--putting engineering into biology. *Bioinformatics* **22**: 2790-2799.

- [74] Herai S, Hashimoto Y, Higashibata H, Maseda H, Ikeda H, Omura S & Kobayashi M (2004) Hyper-inducible expression system for streptomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14031-14035.
- [75] Hermann T & Patel DJ (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **287**: 820-825.
- [76] Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD, Rowland JJ, Kell DB, Bibb MJ & Chater KF (2002) Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **46**: 917-932.
- [77] Hodgson DA (2000) Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol* **42**: 47-238.
- [78] Holeman LA, Robinson SL, Szostak JW & Wilson C (1998) Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold Des* **3**: 423-431.
- [79] Holmes DJ, Caso JL & Thompson CJ (1993) Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*. *EMBO J* **12**: 3183-3191.
- [80] Homann M & Goringe HU (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* **27**: 2006-2014.
- [81] Hoppmann C, Seedorff S, Richter A, Fabian H, Schmieder P, Ruck-Braun K & Beyermann M (2009) Light-directed protein binding of a biologically relevant beta-sheet. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 6636-6639.
- [82] Horbal L, Fedorenko V & Luzhetskyy A (2014) Novel and tightly regulated resorcinol and cumate-inducible expression systems for *Streptomyces* and other actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 8641-8655.
- [83] Iliuk AB, Hu L & Tao WA (2011) Aptamer in bioanalytical applications. *Anal Chem* **83**: 4440-4452.
- [84] Irie M (2010) Photochromism of diarylethene molecules and crystals. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**: 472-483.
- [85] Isaacs FJ, Dwyer DJ & Collins JJ (2006) RNA synthetic biology. *Nat Biotechnol* **24**: 545-554.
- [86] Ito H, Liang X, Nishioka H & Asanuma H (2010) Construction of photoresponsive RNA for photoswitching RNA hybridization. *Org Biomol Chem* **8**: 5519-5524.
- [87] Jäschke A (2012) Genetically encoded RNA photoswitches as tools for the control of gene expression. *FEBS Lett* **586**: 2106-2111.
- [88] Jayasena SD (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* **45**: 1628-1650.
- [89] Jenison RD, Gill SC, Pardi A & Polisky B (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**: 1425-1429.
- [90] Jenkins JL, Krucinska J, McCarty RM, Bandarian V & Wedekind JE (2011) Comparison of a preQ1 riboswitch aptamer in metabolite-bound and free states with implications for gene regulation. *J Biol Chem* **286**: 24626-24637.
- [91] Jeong S, Eom T, Kim S, Lee S & Yu J (2001) *In vitro* selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 237-243.
- [92] Jonsbu E, McIntyre M & Nielsen J (2002) The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J Biotechnol* **95**: 133-144.

- [93] Kaspar C (2013) Selektion und Charakterisierung von RNA-Aptameren gegen photoisomerisierbare Substanzen. *Bachelor Thesis, Technische Universität Darmstadt*.
- [94] Keefe AD, Pai S & Ellington A (2010) Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 537-550.
- [95] Kempter C, Kaiser D, Haag S, *et al.* (1997) CDA: Calcium-Dependent Peptide Antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) Containing Unusual Residues. *Angewandte Chemie International Edition in English* **36**: 498-501.
- [96] Kertesz M, Wan Y, Mazor E, Rinn JL, Nutter RC, Chang HY & Segal E (2010) Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast. *Nature* **467**: 103-107.
- [97] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF & Hopwood DA (2000) Practical *Streptomyces* genetics. *The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom*.
- [98] Kiga D, Futamura Y, Sakamoto K & Yokoyama S (1998) An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition. *Nucleic Acids Res* **26**: 1755-1760.
- [99] Kim DS, Gusti V, Pillai SG & Gaur RK (2005) An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA* **11**: 1667-1677.
- [100] Kladwang W, Hum J & Das R (2012) Ultraviolet shadowing of RNA can cause significant chemical damage in seconds. *Sci Rep* **2**: 517.
- [101] Koch AL (1956) The metabolism of methylpurines by *Escherichia coli*. I. Tracer studies. *J Biol Chem* **219**: 181-188.
- [102] Koizumi M & Breaker RR (2000) Molecular recognition of cAMP by an RNA aptamer. *Biochemistry* **39**: 8983-8992.
- [103] Kwon M, Chun SM, Jeong S & Yu J (2001) *In vitro* selection of RNA against kanamycin B. *Mol Cells* **11**: 303-311.
- [104] Labes G, Bibb M & Wohlleben W (1997) Isolation and characterization of a strong promoter element from the *Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (*aacC1*) of Tn1696 as reporter. *Microbiology* **143** (Pt 5): 1503-1512.
- [105] Lato SM, Boles AR & Ellington AD (1995) *In vitro* selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chem Biol* **2**: 291-303.
- [106] Lee HW, Robinson SG, Bandyopadhyay S, Mitchell RH & Sen D (2007) Reversible photo-regulation of a hammerhead ribozyme using a diffusible effector. *J Mol Biol* **371**: 1163-1173.
- [107] Lin Y, Qiu Q, Gill SC & Jayasena SD (1994) Modified RNA sequence pools for *in vitro* selection. *Nucleic Acids Res* **22**: 5229-5234.
- [108] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW & Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 3-26.
- [109] Lorsch JR & Szostak JW (1994) *In vitro* selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry* **33**: 973-982.
- [110] Lünse CE, Schuller A & Mayer G (2013) The promise of riboswitches as potential antibacterial drug targets. *Int J Med Microbiol*.
- [111] Lussier FX, Denis F & Shareck F (2010) Adaptation of the highly productive T7 expression system to *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 967-970.

- [112] Lynch SA, Desai SK, Sajja HK & Gallivan JP (2007) A high-throughput screen for synthetic riboswitches reveals mechanistic insights into their function. *Chem Biol* **14**: 173-184.
- [113] Ma J, Campbell A & Karlin S (2002) Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J Bacteriol* **184**: 5733-5745.
- [114] Majerfeld I & Yarus M (1998) Isoleucine:RNA sites with associated coding sequences. *RNA* **4**: 471-478.
- [115] Mandal M & Breaker RR (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 29-35.
- [116] Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC & Breaker RR (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**: 577-586.
- [117] Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL & Breaker RR (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* **306**: 275-279.
- [118] Mann D, Reinemann C, Stoltenburg R & Strehlitz B (2005) *In vitro* selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 1928-1934.
- [119] Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yague P & Sanchez J (2008) Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3877-3886.
- [120] Mayer G (2009) The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 2672-2689.
- [121] Mayer G & Heckel A (2006) Biologically active molecules with a "light switch". *Angew Chem Int Ed Engl* **45**: 4900-4921.
- [122] Mazodier P & Davies J (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu Rev Genet* **25**: 147-171.
- [123] McCarthy AJ & Williams ST (1992) Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* **115**: 189-192.
- [124] McKeague M & DeRosa MC (2012) Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J Nucleic Acids* **2012**: 748913.
- [125] McKeague M, Bradley CR, De Girolamo A, Visconti A, Miller JD & DeRosa MC (2010) Screening and initial binding assessment of Fumonisin B(1) aptamers. *Int J Mol Sci* **11**: 4864-4881.
- [126] Meli M, Vergne J, Decout JL & Maurel MC (2002) Adenine-aptamer complexes: a bipartite RNA site that binds the adenine nucleic base. *J Biol Chem* **277**: 2104-2111.
- [127] Mellin JR & Cossart P (2015) Unexpected versatility in bacterial riboswitches. *Trends Genet* **31**: 150-156.
- [128] Mendonsa SD & Bowser MT (2004) *In vitro* evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc* **126**: 20-21.
- [129] Meyer C, Hahn U & Rentmeister A (2011) Cell-specific aptamers as emerging therapeutics. *J Nucleic Acids* **2011**: 904750.
- [130] Meyer C, Eydelor K, Magbanua E, *et al.* (2012) Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells. *RNA Biol* **9**: 67-80.

- [131] Miguélez EM, Martin C, Manzanal MB & Hardisson C (1992) Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **100**: 351-359.
- [132] Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, *et al.* (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**: 747-756.
- [133] Moody MJ, Young RA, Jones SE & Elliot MA (2013) Comparative analysis of non-coding RNAs in the antibiotic-producing *Streptomyces* bacteria. *BMC Genomics* **14**: 558.
- [134] Müller M, Weigand JE, Weichenrieder O & Suess B (2006) Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Res* **34**: 2607-2617.
- [135] Murakami T, Holt TG & Thompson CJ (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **171**: 1459-1466.
- [136] Myronovskyi M, Welle E, Fedorenko V & Luzhetskyy A (2011) Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5370-5383.
- [137] Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL & Breaker RR (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* **9**: 1043.
- [138] Nakahira Y, Ogawa A, Asano H, Oyama T & Tozawa Y (2013) Theophylline-dependent riboswitch as a novel genetic tool for strict regulation of protein expression in Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* **54**: 1724-1735.
- [139] Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr., Guyer DR & Adamis AP (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 123-132.
- [140] Niazi JH, Lee SJ & Gu MB (2008) Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines. *Bioorg Med Chem* **16**: 7245-7253.
- [141] Ozalp VC, Kavruk M, Dilek O & Bayrac AT (2015) Aptamers: molecular tools for medical diagnosis. *Curr Top Med Chem* **15**: 1125-1137.
- [142] Özçoban C, Halbritter T, Steinwand S, *et al.* (2015) Water-Soluble Py-BIPS Spiropyrans as Photoswitches for Biological Applications. *Organic Letters* **17**: 1517-1520.
- [143] Palchetti I & Mascini M (2008) Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. *Analyst* **133**: 846-854.
- [144] Pan W & Clawson GA (2009) The shorter the better: reducing fixed primer regions of oligonucleotide libraries for aptamer selection. *Molecules* **14**: 1353-1369.
- [145] Pan W, Craven RC, Qiu Q, Wilson CB, Wills JW, Golovine S & Wang JF (1995) Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11509-11513.
- [146] Parsyan A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, Merrick WC & Sonenberg N (2011) mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 235-245.
- [147] Pedrolli D, Langer S, Hobl B, Schwarz J, Hashimoto M & Mack M (2015) The *ribB* FMN riboswitch from *Escherichia coli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. *FEBS J*.

- [148] Qi L, Lucks JB, Liu CC, Mutalik VK & Arkin AP (2012) Engineering naturally occurring *trans*-acting non-coding RNAs to sense molecular signals. *Nucleic Acids Res* **40**: 5775-5786.
- [149] Rao DD, Vorhies JS, Senzer N & Nemunaitis J (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 746-759.
- [150] Rebets Y, Brotz E, Tokovenko B & Luzhetskyy A (2014) Actinomycetes biosynthetic potential: how to bridge *in silico* and *in vivo*? *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**: 387-402.
- [151] Regulski EE & Breaker RR (2008) In-line probing analysis of riboswitches. *Methods Mol Biol* **419**: 53-67.
- [152] Renner C & Moroder L (2006) Azobenzene as conformational switch in model peptides. *Chembiochem* **7**: 868-878.
- [153] Repoila F & Darfeuille F (2009) Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol Cell* **101**: 117-131.
- [154] Reynoso CM, Miller MA, Bina JE, Gallivan JP & Weiss DS (2012) Riboswitches for intracellular study of genes involved in *Francisella* pathogenesis. *MBio* **3**.
- [155] Rieder R, Lang K, Graber D & Micura R (2007) Ligand-induced folding of the adenosine deaminase A-riboswitch and implications on riboswitch translational control. *Chembiochem* **8**: 896-902.
- [156] Robbins-Pianka A, Rice MD & Weir MP (2010) The mRNA landscape at yeast translation initiation sites. *Bioinformatics* **26**: 2651-2655.
- [157] Rodriguez-Garcia A, Combes P, Perez-Redondo R & Smith MC (2005) Natural and synthetic tetracycline-inducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res* **33**: e87.
- [158] Romby P & Charpentier E (2010) An overview of RNAs with regulatory functions in Gram-positive bacteria. *Cell Mol Life Sci* **67**: 217-237.
- [159] Rudd BA & Hopwood DA (1979) Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **114**: 35-43.
- [160] Rudolph MM, Vockenhuber MP & Suess B (2013) Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **159**: 1416-1422.
- [161] Salim NN & Feig AL (2009) Isothermal titration calorimetry of RNA. *Methods* **47**: 198-205.
- [162] Samanta S, Beharry AA, Sadovski O, McCormick TM, Babalhavaeji A, Tropepe V & Woolley GA (2013) Photoswitching azo compounds *in vivo* with red light. *J Am Chem Soc* **135**: 9777-9784.
- [163] Sambrook J & Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [164] Santosh B & Yadava PK (2014) Nucleic acid aptamers: research tools in disease diagnostics and therapeutics. *Biomed Res Int* **2014**: 540451.
- [165] Saran D, Frank J & Burke DH (2003) The tyranny of adenosine recognition among RNA aptamers to coenzyme A. *BMC Evol Biol* **3**: 26.
- [166] Sassanfar M & Szostak JW (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature* **364**: 550-553.

- [167] Sauer N & Stadler R (1993) A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J* **4**: 601-610.
- [168] Sazani PL, Larralde R & Szostak JW (2004) A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *J Am Chem Soc* **126**: 8370-8371.
- [169] Schierling B, Noel AJ, Wende W, *et al.* (2010) Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 1361-1366.
- [170] Scholz O, Thiel A, Hillen W & Niederweis M (2000) Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. *Eur J Biochem* **267**: 1565-1570.
- [171] Schürer H, Stembera K, Knoll D, *et al.* (2001) Aptamers that bind to the antibiotic moenomycin A. *Bioorg Med Chem* **9**: 2557-2563.
- [172] Seeliger JC, Topp S, Sogi KM, Previti ML, Gallivan JP & Bertozzi CR (2012) A riboswitch-based inducible gene expression system for mycobacteria. *PLoS One* **7**: e29266.
- [173] Seiwert SD, Stines Nahreini T, Aigner S, Ahn NG & Uhlenbeck OC (2000) RNA aptamers as pathway-specific MAP kinase inhibitors. *Chem Biol* **7**: 833-843.
- [174] Sharma UK & Chatterji D (2010) Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 646-657.
- [175] Shiman R & Draper DE (2000) Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations. *J Mol Biol* **302**: 79-91.
- [176] Shine J & Dalgarno L (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1342-1346.
- [177] Sinha RP & Hader DP (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* **1**: 225-236.
- [178] Song KM, Jeong E, Jeon W, Cho M & Ban C (2012) Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence-colorimetric methods. *Anal Bioanal Chem* **402**: 2153-2161.
- [179] Soukup GA & Breaker RR (1999) Engineering precision RNA molecular switches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3584-3589.
- [180] Srisawat C & Engelke DR (2001) Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA* **7**: 632-641.
- [181] Stafforst T & Hilvert D (2009) Kinetic characterization of spiropyrans in aqueous media. *Chem Commun (Camb)* 287-288.
- [182] Stoltenburg R, Reinemann C & Strehlitz B (2007) SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* **24**: 381-403.
- [183] Strohl WR (1992) Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res* **20**: 961-974.
- [184] Suess B, Fink B, Berens C, Stentz R & Hillen W (2004) A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res* **32**: 1610-1614.
- [185] Suess B, Hanson S, Berens C, Fink B, Schroeder R & Hillen W (2003) Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* **31**: 1853-1858.

- [186] Sussman D, Nix JC & Wilson C (2000) The structural basis for molecular recognition by the vitamin B 12 RNA aptamer. *Nat Struct Biol* **7**: 53-57.
- [187] Tahiri-Alaoui A, Frigotto L, Manville N, Ibrahim J, Romby P & James W (2002) High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands. *Nucleic Acids Res* **30**: e45.
- [188] Takano E, White J, Thompson CJ & Bibb MJ (1995) Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* **166**: 133-137.
- [189] Tang J & Breaker RR (1997) Rational design of allosteric ribozymes. *Chem Biol* **4**: 453-459.
- [190] Tao J & Frankel AD (1996) Arginine-binding RNAs resembling TAR identified by *in vitro* selection. *Biochemistry* **35**: 2229-2238.
- [191] Tereshko V, Skripkin E & Patel DJ (2003) Encapsulating streptomycin within a small 40-mer RNA. *Chem Biol* **10**: 175-187.
- [192] Topp S & Gallivan JP (2008) Random walks to synthetic riboswitches-a high-throughput selection based on cell motility. *Chembiochem* **9**: 210-213.
- [193] Topp S, Reynoso CM, Seeliger JC, *et al.* (2010) Synthetic riboswitches that induce gene expression in diverse bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7881-7884.
- [194] Tsao SW, Rudd BA, He XG, Chang CJ & Floss HG (1985) Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* **38**: 128-131.
- [195] Tuerk C & Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**: 505-510.
- [196] Tuller T, Waldman YY, Kupiec M & Ruppin E (2010) Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 3645-3650.
- [197] Uguru GC, Mondhe M, Goh S, Hesketh A, Bibb MJ, Good L & Stach JE (2013) Synthetic RNA Silencing of Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS One* **8**: e67509.
- [198] van Keulen G & Dyson PJ (2014) Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Adv Appl Microbiol* **89**: 217-266.
- [199] van Wezel GP, Krabben P, Traag BA, *et al.* (2006) Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5283-5288.
- [200] Vecht-Lifshitz SE, Sasson Y & Braun S (1992) Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*. *J Appl Bacteriol* **72**: 195-200.
- [201] Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA & Gelfand MS (2002) Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res* **30**: 3141-3151.
- [202] Vockenhuber MP & Suess B (2012) *Streptomyces coelicolor* sRNA scr5239 inhibits agarase expression by direct base pairing to the *dagA* coding region. *Microbiology* **158**: 424-435.
- [203] Vockenhuber MP, Heueis N & Suess B (2015) Identification of metE as a Second Target of the sRNA scr5239 in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* **10**: e0120147.

- [204] Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, Kramer RH, Isacoff EY & Trauner D (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol* **2**: 47-52.
- [205] Wachsmuth M, Findeiss S, Weissheimer N, Stadler PF & Morl M (2013) De novo design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination. *Nucleic Acids Res* **41**: 2541-2551.
- [206] Wachter A (2010) Riboswitch-mediated control of gene expression in eukaryotes. *RNA Biol* **7**: 67-76.
- [207] Wallace ST & Schroeder R (1998) *In vitro* selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. *RNA* **4**: 112-123.
- [208] Wallis MG, von Ahsen U, Schroeder R & Famulok M (1995) A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chem Biol* **2**: 543-552.
- [209] Wallis MG, Streicher B, Wank H, *et al.* (1997) *In vitro* selection of a viomycin-binding RNA pseudoknot. *Chem Biol* **4**: 357-366.
- [210] Walsh S, Gardner L, Deiters A & Williams GJ (2014) Intracellular light-activation of riboswitch activity. *Chembiochem* **15**: 1346-1351.
- [211] Wang W, Ji J, Li X, *et al.* (2014) Angucyclines as signals modulate the behaviors of *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 5688-5693.
- [212] Wang Y & Rando RR (1995) Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chem Biol* **2**: 281-290.
- [213] Watve MG, Tickoo R, Jog MM & Bhole BD (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* **176**: 386-390.
- [214] Weigand JE & Suess B (2007) Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res* **35**: 4179-4185.
- [215] Weigand JE, Sanchez M, Gunnesch EB, Zeiher S, Schroeder R & Suess B (2008) Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA* **14**: 89-97.
- [216] Weigand JE, Schmidtke SR, Will TJ, Duchardt-Ferner E, Hammann C, Wohnert J & Suess B (2011) Mechanistic insights into an engineered riboswitch: a switching element which confers riboswitch activity. *Nucleic Acids Res* **39**: 3363-3372.
- [217] Werstuck G & Green MR (1998) Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* **282**: 296-298.
- [218] Westpheling J & Brawner M (1989) Two transcribing activities are involved in expression of the *Streptomyces* galactose operon. *J Bacteriol* **171**: 1355-1361.
- [219] Wieland M & Hartig JS (2008) Improved aptazyme design and *in vivo* screening enable riboswitching in bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 2604-2607.
- [220] Wilson C, Nix J & Szostak J (1998) Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding RNA pseudoknot. *Biochemistry* **37**: 14410-14419.
- [221] Winkler W, Nahvi A & Breaker RR (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**: 952-956.
- [222] Winkler WC, Cohen-Chalamish S & Breaker RR (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15908-15913.
- [223] Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA & Breaker RR (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**: 281-286.

- [224] Wochner A, Cech B, Menger M, Erdmann VA & Glokler J (2007) Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling. *Biotechniques* **43**: 344, 346, 348 passim.
- [225] Wochner A, Menger M, Orgel D, Cech B, Rimmele M, Erdmann VA & Glokler J (2008) A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Anal Biochem* **373**: 34-42.
- [226] Wright F & Bibb MJ (1992) Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.
- [227] Wright LF & Hopwood DA (1976) Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **95**: 96-106.
- [228] Wurtmann EJ & Wolin SL (2009) RNA under attack: cellular handling of RNA damage. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 34-49.
- [229] Yang J & Bowser MT (2012) Capillary electrophoresis-SELEX selection of catalytic DNA aptamers for a small-molecule porphyrin target. *Anal Chem* **85**: 1525-1530.
- [230] Yen L, Svendsen J, Lee JS, *et al.* (2004) Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* **431**: 471-476.
- [231] Yingfu L, Yi L & Silverman S (2009) Artificial Functional Nucleic Acids: Aptamers, Ribozymes, and Deoxyribozymes Identified by *In Vitro* Selection. *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications*, ed. ^eds.), p. ^pp. 47-108. Springer New York.
- [232] Young DD & Deiters A (2008) Light-regulated RNA-small molecule interactions. *Chembiochem* **9**: 1225-1228.
- [233] Zuker M & Sankoff D (1984) RNA secondary structures and their prediction. *Bulletin of Mathematical Biology* **46**: 591-621.

8 Vorträge und Posterbeiträge

30. Rabensteiner Kolleg (2012), Pottenstein, Deutschland

Vortrag: Induzierbare Genexpressionssysteme in *S. coelicolor* mittels synthetischer Riboswitche

RNA-Club (2012), Frankfurt am Main, Deutschland

Vortrag: Inducible gene expression in *S. coelicolor* by means of synthetic riboswitches

Winterschule des SFB902 (2013), Obergurgl, Österreich

Vortrag: Conditional gene expression in Gram-positive bacteria by natural and synthetic riboswitches

31. Rabensteiner Kolleg (2013), Pottenstein, Deutschland

Vortrag: Konditionale Genexpression in *S. coelicolor* mittels synthetischer Riboswitche

Actinobacteria within soils (2013), Münster, Deutschland

Vortrag: Inducible gene expression in *S. coelicolor* by means of synthetic riboswitches

Selective Regulation in Nanoscaled systems (2013), Kloster Banz, Deutschland

Poster: *In vitro* selection of RNA aptamers against photoswitchable small molecules

RNA-Workshop des SFB902 (2013), Bad Homburg, Deutschland

Vortrag: *In vitro*-Selection of RNA aptamers against photoswitches

Winterschule des SFB902 (2014), Obergurgl, Österreich

Vortrag: *In vitro* selection of RNA aptamers against photoswitchable small molecules

Aptamers 2014 (2014), Oxford, Vereinigtes Königreich

Vortrag: *In vitro* selection of RNA aptamers against photoswitchable small molecules

RNA-Club (2015), Frankfurt am Main, Deutschland

Vortrag: RNA aptamers against photoswitchable small molecules

9 Lebenslauf

Name:	Michael <u>Martin</u> Rudolph, Dipl.-Biol.
geboren am:	10.04.1987 in Erfurt
Adresse:	Pankratiusstr. 19, 64289 Darmstadt
Email:	marudo87@gmail.com
HOCHSCHULAUSBILDUNG	
2011 –2015	Goethe-Universität, Frankfurt a.M. Technische Universität Darmstadt, Darmstadt Promotion
2005 –2010	Friedrich-Schiller-Universität, Jena Studium der Biologie Hauptfächer: Mikrobiologie, Genetik, Pharmazeutische Biologie Abschluss: Diplom, Gesamturteil "sehr gut"
2009 –2010	Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI), Abt. Biotechnikum, Jena Diplomarbeit: Molecular Engineering and Evaluation of Reporter Strains for High-throughput Drug Screening on a Microfluidic Platform
BERUFSTÄTIGKEIT	
2010–2011	Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI), Abt. Biotechnikum, Jena Wissenschaftlicher Mitarbeiter
SCHULBILDUNG	
1997–2005	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Ruhla Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Gesamturteil 1,3
1993–1997	Staatliche Grundschule Winterstein/Schmerbach
MITGLIEDSCHAFTEN	
	Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)

Darmstadt, den 15.06.2015

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 14.07.2015

.....

Michael Martin Rudolph